

From the Department of Agricultural Botany, University College of Wales,  
Aberystwyth

## NUCLEAR BEHAVIOUR IN THE CULTIVATED MUSHROOM

By

H. J. EVANS

With 27 Figures in the Text

(Eingegangen am 28. Juli 1958)

The widespread occurrence of the mushroom, coupled with the edibility of its many varietal forms, has made the species the object of a great deal of study. Of the two varieties which are wellknown, the two-spored cultivated variety—*Agaricus campestris* Fr. var. *bisporus*—has received more attention, although a considerable amount of study has been devoted to the four-spored field mushroom (CAYLEY 1937, 1938; KLOUSHNIKOVA 1939). Much of the work on the two-spored form has been concerned with the developmental morphology of the fruiting body (ATKINSON 1906; LEVINE 1922) and, of course, with the nutritional requirements and cultural conditions necessary for prolific fruit production (see LAMBERT 1938; TRESCHOW 1944, and STOLLER 1954). It would appear that the genetical approach to the problem of increased productivity has been sadly neglected, and apart from the work of SINDEN (1937), cited by KLIGMAN (1943), and that of KLIGMAN himself, few genetic studies have been undertaken.

In addition to the numerous studies on the culture of the mushroom the species has attracted a great deal of cytological attention, most of which has been devoted to studies on the nuclei in the basidium. HIRMER (1920), COLSON (1935) and KLIGMAN (1943) studied the distribution of the nuclei in the hyphae, but most of the published work (MAIRE 1902; SASS 1928, 1936; COLSON 1935, and SARAZIN 1938, 1939) has been concerned with the meiotic process and with the behaviour of the resultant haploid nuclei in the basidium and basidiospores. Inconsistencies between these reports warranted further investigation on nuclear behaviour both in the basidia and also in the somatic cells.

### Materials and methods

The mycelia and fructifications used throughout this work were produced from spawn of the large white variety of cultivated mushroom which is grown on a commercial scale in Britain.

For studies on mitosis two types of materials were used: mycelia taken from the margins of cultures grown on a medium of 4% malt extract and 2% agar, and young "pinhead" fructifications two to four millimetres in diameter. "Pinhead"

tissue was preferred as the compacted cells of the mushroom initial contained a larger number of dividing nuclei and, in addition, this material offered fewer technical difficulties than did mycelium cultured on agar.

Observations on meiosis and basidiospore formation were made from fixations of small pieces of gills taken from fructifications in which the veil had ruptured. There is no synchronisation of division between basidia, and all stages in nuclear division and spore development were found.

A wide variety of fixatives and stains were used, in conjunction with squash and sectioning methods; fixations were made in a number of formalin fixatives (RANDOLPHS 1935; NAVASCHIN 1925; SANFELICE WHITE 1940) and an osmic fixative (La Cour 2 B.D., 1931) as formulated by DARLINGTON and LA COUR (1947). Each of the four fixatives tested was found to give good fixation, although for most of the work Randolphs and Navaschins solutions were used. Section techniques were only used in the study of certain stages of meiosis. For this purpose sections of gill tissue were cut at thicknesses of 8–12  $\mu$  and stained in a 0.5% solution of crystal violet. Leuco-basic fuchsin and methyl green, two stains which are specific for deoxyribonucleic acid, were also used, but attempts with the Feulgen technique proved unsuccessful even after varying the temperature and duration of hydrolysis. Success was obtained with methyl green when used according to the schedule of POLLISTER and LEUCHTENBERGER (1949), but for most of the work crystal violet was preferred.

Squash preparations were made from materials fixed in a number of alcoholic fixatives: acetic-alcohol, Carnoys, Smiths and Carnoy-Lebrun (DARLINGTON and LA COUR 1947). The proportion of constituents in each fixative was varied, the best fixation being obtained from a modification of Carnoys fluid made up of seven parts chloroform, five parts alcohol and two parts glacial acetic acid. Acetic-alcohol gave good fixation but the modified Carnoys fluid was superior, as the chloroform fraction of the fixative removed some of the fatty compounds present in the cell cytoplasm. The preparations were stained in either a strong solution of acetic-orcein, or in weak aceto-carmine used in conjunction with a drop of iron acetate; both techniques gave good staining and clear differentiation between chromosomes and cytoplasm. When using acetic-orcein it was found that the nucleoli did not take up the stain, so that when details of nucleolar behaviour were required aceto-carmine was used.

### Nuclear phenomena in the somatic cells

It has been shown that the somatic cells are multinucleate and may contain a varying number of nuclei (HIRMER 1920). COLSON (1935) found that in fully expanded fructifications the cells of the stipe contained from six to eight nuclei, and those of the pileus from four to six nuclei. A further reduction in the number of nuclei per cell was apparent in those tissues which give rise to the trama and subsequently the hymenium; cells in these latter regions usually containing two nuclei so that the basidia are binucleate.

In the present work some attention was devoted to those cells in the pileus which are not concerned with the formation of basidia, and nuclear counts were made from pieces of pileal tissue taken from five mushrooms. In every sample the number of nuclei in each of 350 cells was scored and since no significant differences were found between samples the data from the five mushrooms were pooled, and a mean of  $6.44 \pm 0.08$  nuclei per cell was determined. In the total of 1,750 cells

scored, a wide range in the nuclear complement per cell was found. A number of cells were seen to be uninucleate, whereas at the other extreme many cells contained more than twenty nuclei and in one instance a cell containing thirty-six nuclei was recorded.

Generally, uninucleate cells arise as a result of septation of an original multinucleate cell, as cross wall formation is not associated with nuclear reproduction. Little nuclear division occurs after the early "button" stage in the development of the fructification so that, as a result of septation, low nuclear complements are found most frequently in older

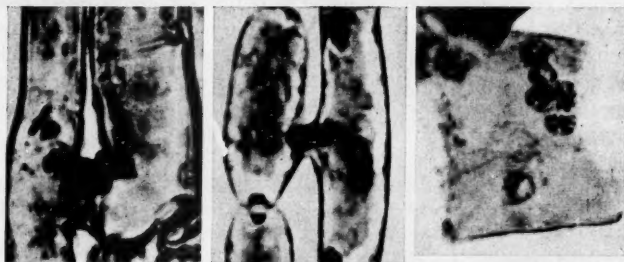


Fig. 1

Fig. 2

Fig. 3

Figs. 1—3. Nuclear migration between cells. Fig. 1. Cells of the trama tissue. Fig. 2. Cells of mycelium cultured on agar. Note the densely staining *homogenous* resting nuclei and the hemispherical plug in the cross wall between two of the cells. All figures  $\times$  ca. 2000. Fig. 3. Resting nuclei of the granular *expanded* type in one of the large vacuolated cells of the pileus

cells. A further factor influencing nuclear distribution is the process of nuclear migration which may take place between adjacent cells. This phenomenon has been observed to occur between cells of the trama in the fructification, and also between cells of mycelium cultured on agar. Migration is accomplished by the passing of nuclei through small connecting tubes which are formed between the cells (Fig. 1 and 2). Throughout the process of migration, the nuclei retain their resting stage appearance and do not become highly condensed and distorted like the nuclei which migrate from the basidia into the basidiospores. Anastomoses and cell fusion have been observed in a number of fungi and these processes are presumed to serve a nutritive function (GWYNNE-VAUGHAN and BARNES 1937). In the mushroom, HEIN (1930) described a process of cell fusion which facilitates movement of food materials from cell to cell. Cell fusion due to the dissolution of adjacent hyphal walls is a different process from the development of connecting tubes between cells, and it is possible that the latter form of cell connection is concerned primarily with nuclear and not food transfer.

The resting nuclei were found to be heterogeneous in respect of both size and stainability. The larger resting nuclei are between 1.5 to

$2\mu$  in diameter and are characterised by having a clear nuclear sap which does not show any affinity for stain: the nucleolus and chromocentres, however, stain with pyronin, aceto-carmin and crystal violet. This type of resting nucleus is granular in appearance (Fig. 3) and does not take up methyl green, a situation which is remarkably similar to that existing in the egg cell nuclei of Angiosperms, where the nucleus has identical staining properties. The smaller resting nuclei stain deeply with methyl green, aceto-carmin, acetic-orcin and crystal violet, and appear as dense bodies (Fig. 2) which are a little larger in size than the compact, newly-divided nuclei found in mitotically active cells. It was found that the densely staining type of resting nucleus was more common in cells of young "pinhead" fructifications, in the sub-hymenium and trama tissues, and in hyphae cultured on agar. The larger granular type of resting nucleus is more frequent in older vacuolated cells of the fructification, but both types of nuclei are sometimes found in the same cell.

The presence of two kinds of resting nuclei has been noted in a number of Basidiomycetes. SAVILE (1939) reported that the nuclei in some species of Uredinales, and also in a species of *Mycena*, may exist in either of two states, the *expanded* state where the nucleus is a non-staining body containing a stainable sphere, and the *unexpanded* state where the nucleus is compact and densely stained. It would appear that the *unexpanded* and *expanded* states are stages in the development of the resting nucleus, the *unexpanded* condition representing nuclei which have recently undergone mitosis, and the *expanded* type being the mature resting nucleus. This developmental sequence is obviously present in the cultivated mushroom and the large granular nuclei are undoubtedly of the *expanded* type. The small dense nuclei, however, are of two kinds, one of which conforms to SAVILE's *unexpanded* nuclei, i.e. those nuclei which have newly passed through mitosis, whilst the other type of nucleus is a little larger in size, being about  $1.5\mu$  in diameter. Nuclei of this latter type do not owe their compactness to the after effects of a recent mitosis as they may be found in cells, such as young basidia and trama cells, in which mitosis does not occur.

Studies on the mitotic process in fungi are rendered difficult by the small size of the nuclei and chromosomes, and by the retention of the nuclear membrane during the division process so that chromosome spreading is impeded. Further obstacles, which are also responsible for the paucity of information on the fungal mitotic nucleus, are the thick cell walls and the presence of fatty deposits in the cytoplasm. In this material the latter difficulties were overcome by using the modified Carnoy's solution as a fixative.

As in higher plants and animals, the duration of mitosis in the mushroom is considerably less than the duration of the meiotic division. This observation is evidenced by the relative infrequency of mitosis even in the tips of actively growing hyphae cultured on agar. When mitosis commences, the resting nuclei increase in volume, prophase nuclei measuring between  $2-3\mu$  in diameter. The chromosomes first appear at prophase as long threads, some of which have swollen heterochromatic regions which stain intensely. These nuclei are haploid and



contain a single nucleolus which is especially prominent at early prophase. As the prophase stage progresses the nucleolus decreases in size (Fig. 4) and finally disappears. Nucleolar disappearance at mitosis in Angiosperms heralds the dissolution of the nuclear membrane and the organisation of the spindle. In the mushroom, spindle organisation occurs shortly after the disappearance of the nucleolus, but throughout this stage the nuclear membrane remains intact so that the spindle is completely within the nucleus. This intra-nuclear spindle is organised without the aid of centrosomes, bodies of this kind never being observed at any stage of mitosis.

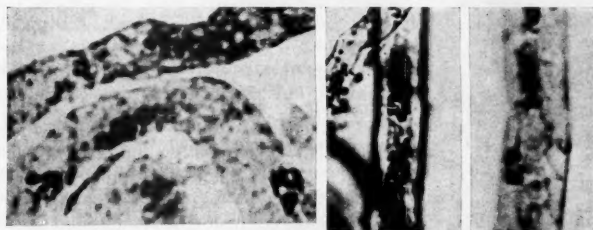


Fig. 4

Fig. 5

Fig. 6

Figs. 4—6. Stages of mitosis. Fig. 4. Prophase. Note diminution in size of nucleoli and synchrony in division. Fig. 5. Prometaphase. The nuclear membrane is persistent and defines the clear area of the nucleus. Fig. 6. Telophase

A prometaphase stage between the end of prophase, i.e. the time when the nucleolus disappears, and the beginning of true metaphase, when the chromosomes align themselves on the spindle, can be recognised. At this stage, the chromosomes are contracted and lie scattered within the nucleus (Fig. 5). The condensation of the chromosomes, which can be observed throughout prophase and prometaphase, reaches a maximum at metaphase, but at this stage the chromosomes rarely appear as distinct bodies and are usually clumped on the metaphase plate. The metaphase nucleus thus appears as a nonstaining sphere which is clearly delimited from the surrounding cytoplasm and contains a central mass of deeply staining chromatin. The clumping of the chromosomes, which appears to be due to the cohesion of heterochromatic segments, and the persistent nuclear membrane, did not permit accurate observations of the metaphase chromosomes. In view of this, chromosome counting in mitotic nuclei was not profitable.

Anaphase separation occurs rapidly and at this stage the chromosomes on the spindle equator separate into two groups which pass to the spindle poles. In favourable preparations the anaphase chromatids can be clearly distinguished, but more usually they are clumped together.

This stickiness sometimes results in the formation of "sticky" bridges which connect the two anaphase groups and may persist into late anaphase or early telophase (Fig. 6). In late anaphase nuclei, the spindle appears to become elongated whilst still enclosed within the nuclear membrane: later at the telophase stage, the nuclear membrane becomes constricted in the region between the two telophase groups, whilst the newly-formed daughter nuclei begin to expand. The fate of the nuclear membrane could not be clearly followed at this stage and although it is likely that it never disappears but becomes pinched off between

daughter nuclei, it is possible that each daughter nucleus produces its own nuclear envelope, and that the original parent membrane disappears at late telophase.

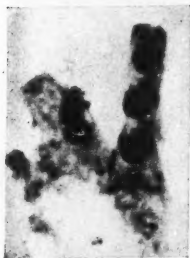


Fig. 7. Three abnormally large resting nuclei of the homogeneous type in a cell of the pileus. These nuclei are probably polyploid, cf. Figs. 2 and 3

The two nuclei produced as a result of mitosis are thus, at first, compact densely staining bodies which soon expand and assume one of the two resting conditions. In order to distinguish between the *unexpanded* nuclear state and the mature densely staining resting nucleus, and to avoid possible confusion, it is suggested that the term *homogeneous* (PINTO-LOPES 1949) be used to describe nuclei in the latter condition.

Usually, mitoses occur randomly within the cell, but in a number of cells groups of nuclei, which appeared to be closely associated, were sometimes seen to divide synchronously. The simultaneous division of nuclei in small groups suggests either that these nuclei have arisen from successive mitoses within the group, so that the mitotic cycles are synchronised, or, that mitosis is triggered off by some diffusible substance within the cell. The ratio of cytoplasmic to nuclear volume is very much greater in the somatic cells of the mushroom than in the cells of higher plants and animals. There is no space limitation imposed upon the dividing nuclei by the cell walls, so that there is no pre-determined alignment of spindles and no co-ordination between the spindle alignments of synchronously dividing nuclei.

In some cells of the mature pileus, a few nuclei were found which were several times larger than normal haploid nuclei, being from  $2.5-4\mu$  in diameter (Fig. 7). These large nuclei were in a *homogeneous* resting state and were never observed to undergo mitosis. Resting nuclei which do not normally undergo mitosis and which are very much larger than the normal diploid resting nucleus, have been observed in the differentiated regions of the roots of Angiosperms. Nuclei of this type have been induced to undergo mitosis by suitable treatment with hormones and have been shown to be polyploid (HUSKINS and STEINITZ 1948). It is possible that the large nuclei observed in cells of the mature mushroom are also polyploid,

as nuclei of similar appearance and dimensions are often present in abnormally induced mushroom tissue where they have been observed to undergo mitosis and are known to be polyploid (unpublished data).

### Nuclear phenomena in the basidia

The variation in nuclear number between the somatic cells is in marked contrast to the fixed binucleate condition of the cells in the hymenial region of the fructification.

This reduction in the nuclear complement of those cells which differentiate into, or are associated with, the hymenium is the result of a number of processes. HIRMER (1920) pointed out that a reduction in nuclear number can occur through the non-division of one or more nuclei in the multinucleate cells undergoing cell division. Actually, it is not the non-division of nuclei which is important, but rather the fact that cell wall formation is independent of nuclear division. A reduction in nuclear number can be rapidly brought about by the formation of one or more cross walls in a cell, and cross wall formation will, of course, be more effective if nuclear division does not occur. One other mechanism which may play a part in the reduction in the nuclear complements of cells is the process of nuclear migration. However, there are reasons for believing that this process may be unimportant in a quantitative sense, but may be of greater significance in relation to other aspects of the meiotic process which will be discussed later.

The two nuclei in the cells of the sub-hymenium and in the young basidia, are always in a *homogeneous* resting state; but after the basidia increase in size these nuclei assume the typical granular *expanded* resting condition.

Shortly before fusion occurs the two nuclei migrate to the swollen end of the basidium, come into contact with one another (Fig. 8) and fuse, whilst still in the *expanded* resting state, to give the only truly diploid stage in the life cycle of the plant (Fig. 9). After fusion, the diploid nucleus rapidly enlarges and attains a diameter of  $4.5-5.5 \mu$ . Its volume is thus very much greater than twice the volume of the haploid nuclei. The young fusion nucleus does not enter into meiosis immediately on its inception, but has a brief resting period between fusion and subsequent division. In this intermediary stage the two nucleoli and the heteropycnotic regions of the unpaired chromosomes clearly distinguish the two chromosome groups (Fig. 9).

At the first clearly recognisable stage of meiosis the two nucleoli come together and fuse and the chromosome threads become polarised towards one side of the nucleus giving a typical "bouquet" appearance.



Fig. 8. A young basidium showing the two haploid nuclei in contact with one another prior to fusion. Both the nuclei are in an *expanded* resting state. Note the prominent nucleoli

As the nucleolus is located in a sub-terminal position in one of the long chromosomes, the ends of individual chromosomes are directed towards the nucleolar side of the nucleus (Fig. 10). The "bouquet" appearance is lost at pachytene and the paired chromosomes become scattered within the nucleus (Fig. 11). Measurements of the relative lengths of some of the chromosome were made at pachytene and at this phase of meiosis the longest chromosome measured approximately  $5.5\mu$ . Two

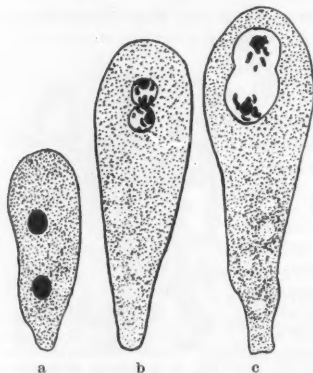


Fig. 9a—c. Stages in the development of the basidium and in the formation of the diploid fusion nucleus. (a) Young basidium containing two haploid nuclei which are in a homogeneous resting state. (b) A later stage showing the expanded state of the two nuclei which are now in contact, cf. Fig. 8. (c) The enlarging diploid nucleus showing the separate nucleoli and chromocentres

other long chromosomes were both about  $5\mu$  in length, but these could be separately distinguished as one was the nucleolar chromosome. Measurements on the remainder of the chromosome complement were made with difficulty; at least four of the chromosomes were about  $3.5\mu$  long whilst the smallest member was about one-fifth the length of the longest chromosome, measuring a little over  $1\mu$ . These measurements of chromosome length are of little value in themselves but are useful for comparison with the published measurements of the genetically well known chromosomes of *Neurospora*. MCCLINTOCK (1945) and SINGLETON (1953) published drawings and photographs of the pachytene chromosomes of *Neurospora crassa* and showed that the largest chromosome was 2.7 times the length of

the smallest member of the complement, the long chromosome measuring more than  $15\mu$ . The chromosomes of *Neurospora crassa* are thus much larger than the mushroom chromosomes and in the latter species there would appear to be a relatively greater range between chromosome size.

The position of the centromeres could not be determined with any degree of accuracy even in the more advanced nuclei; in addition, at diplotene and diakinesis, the small size of the chromosomes and the sticky connections between their heterochromatic regions obscured details of chiasmata (Fig. 12). Accurate chromosome counts could not be made at these stages and consistent results were only obtained from studies on the fully contracted metaphase chromosomes. Observations on the metaphase chromosomes were further facilitated as at meiosis

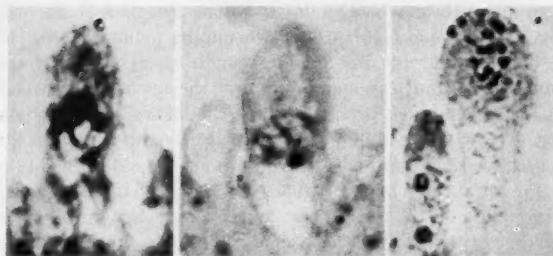


Fig. 10

Fig. 11

Fig. 12

Figs. 10—12. Meiotic prophase stage. Fig. 10. A zygotene nucleus showing the "bouquet" arrangement, the chromosomes being polarised towards the nucleolar side of the nucleus. Fig. 11. Pachytene, showing the absence of polarisation the paired chromosomes being scattered within the nucleus. Fig. 12. Diakinesis. In this nucleus the nuclear membrane had ruptured so that the chromosomes were spread. Note the lightly staining heterochromatic regions which form sticky connections between bivalents

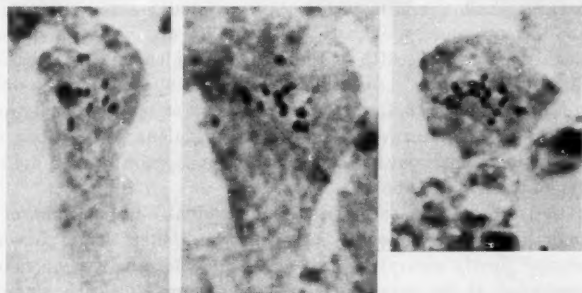


Fig. 13



Fig. 14



Fig. 15

Figs. 13—15. First meiotic division stages. Above: photomicrographs; below: drawings of the same cells. Fig. 13. Metaphase I showing the twelve rod bivalents. In this cell the nucleolus has persisted to an unusually late stage. Note the small bivalent (at 11 o'clock) showing early separation of its chromosomes. In the diagram, bivalents showing secondary association are indicated by arrows. Fig. 14. Late metaphase I showing the twelve bivalents. Note the small bivalent and the secondary association indicated by the arrow in the diagram. Fig. 15. Early anaphase I with twenty half bivalents and two bivalents. A connecting line has been drawn between homologous chromosomes in the diagram

the nuclear membrane breaks down before the metaphase stage, so that adequate chromosome spreading could be achieved (Fig. 13, 14).

The development of the meiotic spindle coincides with the disappearance of the nuclear membrane and the nucleolus, although the nucleolus may sometimes persist well into the metaphase stage (Fig. 13). The first division spindle is always aligned at right angles to the long axis of the basidium and is organised without the aid of visible centrosomes. Earlier authors (COLSON 1935, and SARAZIN 1938) have reported that the spindle is organised by centrosomes, but in the material used in this investigation centrosomes were not observed at meiosis or mitosis, even when using the techniques of earlier workers.

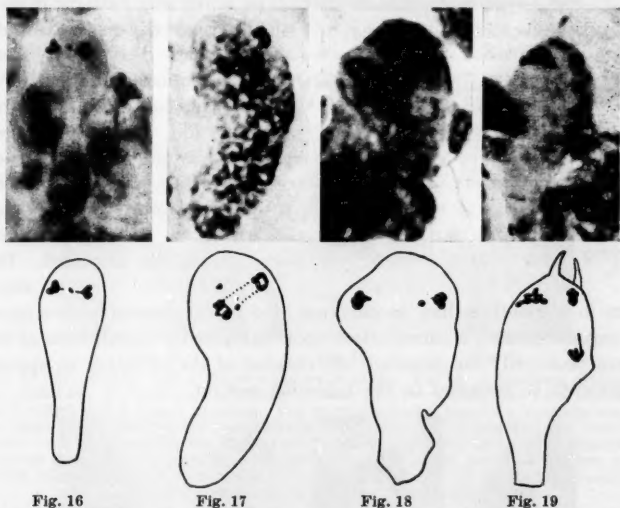
At the first metaphase stage of meiosis, twelve bivalents could be clearly seen to be arranged around the periphery of the spindle. This haploid chromosome number of  $n=12$  differs from any of the determinations previously published (SASS 1928; COLSON 1935, and SARAZIN 1938) and is the highest chromosome number recorded for the species. The bivalent chromosomes are quite distinct but are very small, being contracted to about one-fifth of their pachytene length. An occasional tendency for secondary association of bivalents appeared to be due to stickiness between the heterochromatic regions of some of the chromosomes (Fig. 13, 14); however, no true multivalent associations were found and the meiotic pairing and segregation did not disclose evidence of polyploidy (EVANS 1956).

At the late metaphase stage, the individual chromosomes of the two smallest bivalents frequently show early terminalisation of chiasmata and become clearly separated (Fig. 13, 14). As terminalisation is often not completed at the same time in all bivalents, the early anaphase chromosomes appear to be scattered along the spindle (Fig. 15). Lag-gard chromosomes were found in nearly 10% of the divisions, whilst anaphase bridges were about half as frequent (Fig. 16—18). The bridges could be the result of inversion or of delayed terminalisation of chiasmata due to sticky heterochromatin; the presence of fragments with some of the bridges, however, is strongly suggestive of inversion heterozygosity. The peripheral arrangement of the chromosomes with regard to the spindle is apparent at the late anaphase, as the chromatin groups appear to have a double nature when viewed from the side (Fig. 17).

The telophase nuclei are at first compact but soon increase in size and the nucleoli become reconstituted. At this stage the chromosomes lose their stain affinity and a clear nuclear sap is evident. This *expanded* resting condition is of brief duration and is quickly followed by the second division of meiosis, the nuclei usually dividing in a synchronous manner. The termination of the resting stage in the daughter nuclei

is marked by the disappearance of the nucleoli and the appearance of chromosomes which are appreciably contracted. As in the first division, laggard chromosomes and chromatin bridges were sometimes found at anaphase (Fig. 19).

A particularly interesting feature of the second division of meiosis is the variation in the alignment of the spindles. This variation is prob-



Figs. 16—19. Meiotic chromosome aberrations. Above: photomicrographs, below: drawings of the same cells. Fig. 16. A chromatin bridge at anaphase I. Note the double nature of the anaphase groups. Fig. 17. Late anaphase I with two laggard chromosomes. The peripheral arrangement of the chromatin around the spindle can be clearly seen. Fig. 18. Telophase I nuclei showing a fragment and the remains of a bridge. Fig. 19. Second division of meiosis showing a metaphase and two anaphase groups. The remains of a bridge between the two anaphase nuclei can be clearly seen

ably due to slight differences in the shape and size of the cells, resulting in differences in the amount of space available for the organisation of the long spindles. The type of spindle alignment in any given basidium conforms to one of four categories (Table 1):


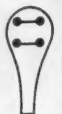



(A) Spindles parallel to one another and parallel to the longitudinal axis of the basidium (Fig. 20).

(B) Spindles parallel to one another but aligned at right angles to the longitudinal axis of the basidium. As the basidium in transverse section has a circular outline, these spindles are at different levels with respect to the longitudinal axis of the basidium (Fig. 21).



(C) Spindles which are aligned at right angles to each other and lie in a plane at right angles to the longitudinal axis of the basidium (Fig. 22).

Table 1. *The types of spindle alignment found at the second division of meiosis. All diagrams excepting that of type C are side views of the basidia. The relative frequencies of the various classes were determined through counts made on sectioned material*

Type	A	B	C	D <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>
					
Number of cells counted	19	32	52	6	
Frequency %	17.4	29.4	47.7	5.5	

(D) Spindles which do not fall directly into one of the above classes.

The frequency of the various patterns of nuclear division (Table 1) was determined from sectioned material. For photographic illustration, gently squashed preparations were used, and consequently in the accompanying illustrations the spindles are slightly displaced. The type of spindle alignment

in a basidium has, in the case of a fusion nucleus heterozygous for certain factors, a direct effect upon the genetic constitution of the spores produced; the genetical significance of the variation in spindle alignments is discussed in the following section.

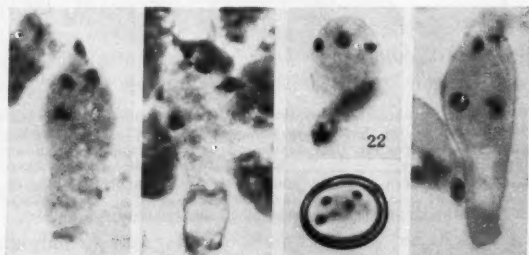


Fig. 20

Fig. 21

Fig. 22

Fig. 23

Figs. 20—24. Basidia with different second meiotic division types. Fig. 20. Basidium showing the type A second division of meiosis. The nuclei have been slightly displaced in the preparation of the slide but the type of spindle alignment is still evident. Fig. 21. Basidium showing the type B second division of meiosis. The two telophase nuclei at the sterigmatal end of the basidium are joined by a chromatin bridge. Fig. 22. Basidium showing the type C second division of meiosis. Only three nuclei can be seen from this plane of view. Fig. 23. Nuclear migration from the basidium into the sterigmata. Fig. 24. Mature thick walled basidiospore containing four nuclei

When the basidia have reached their maximum size, the two sterigmata develop. Sterigma formation is dependent upon the size of the basidium and is not synchronised with a particular stage of meiosis; usually, however, sterigma initials appear towards the end of the second

division. After completion of meiosis, the four haploid nuclei in the basidium take up a granular *expanded* resting stage appearance. This stage is of short duration as spore initials develop at the tips of the sterigmata and the nuclei soon become *homogeneous* and compacted. The two nuclei near the sterigmatal end of the basidium pass one into each sterigma (Fig. 23), and thence into the developing spores: the remaining two nuclei follow so that the basidiospores become binucleate. During the passage of the nuclei through the horn-shaped sterigmata,

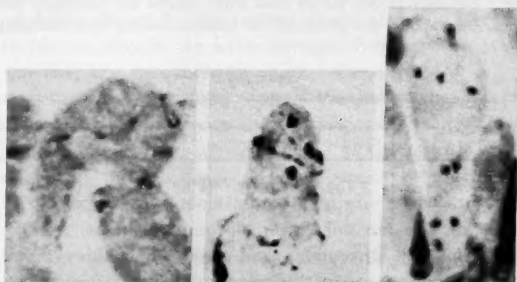


Fig. 25

Fig. 26

Fig. 27

Figs. 25—27. Basidia with different numbers of nuclei. Fig. 25. A basidium containing four nuclei two of which are undergoing mitosis. The two resting nuclei are located at the 3 o'clock and 9 o'clock positions. Two anaphase groups joined by a spindle occupy the centre of the basidium and the other dividing nucleus is at metaphase. The basidium in the lower right hand corner of the figure contains two telophase I nuclei. Fig. 26. A basidium containing six nuclei. The extra nuclei have arisen as a result of two post-meiotic mitoses. Note the remains of a chromosome bridge. Fig. 27. A basidium containing eight nuclei and possessing two fully formed sterigmata

the nuclei become elongated and V shaped, the angle of the V being directed towards the spores (COLSON 1935). The two nuclei in each basidiospore undergo mitosis before the spore is shed, so that the thick walled spores have four nuclei (Fig. 24). A further mitosis may occur after the spore is shed so that the mature spores may contain from four to eight nuclei.

In rare instances, some, or all, of the four nuclei in the basidium undergo an additional mitotic division within the basidium itself (Fig. 25—27). In these abnormal basidia eight nuclei are usually present, although some basidia containing six resting nuclei have been found. These basidia have two fully developed sterigmata and appear quite normal in all other respects, although at the time of fixation spore initials had not developed at the tips of the sterigmata. It would thus appear that the increased nuclear number in these abnormal basidia was due to delay in the development of the basidiospore initials in relation to the cycle of nuclear division. A surface examination of the gills showed

that not all the basidia were two-spored, as a small percentage bore one, three, or four basidiospores. This fact has been reported by a number of authors, the frequency of anomalous types in this material (Table 1) being similar to that found by CAYLEY (1936).

Little information concerning nuclear behaviour in the non-bisporous basidia has been obtained. The few basidia bearing one, three, or four sterigmata have each contained the normal complement of four haploid nuclei. Although uninucleate spores have been found, generally their uninucleate condition can be attributed to their artificial and premature detachment in the making of the preparation. SARAZIN (1938) found that some spores are normally uninucleate, but whether these spores are produced on basidia bearing four sterigmata is not known.

Table 2

Author	Basidia				
	Counted	1 Spored	2 Spored	3 Spored	4 Spored
CAYLEY (1936) . .	1,102	6.7%	82.2%	5.6%	0.36%
Present Work. . .	319	4.0%	91.6%	3.8%	0.6%

### Discussion and conclusions

The multinucleate condition of the mushroom cell and the range in nuclear number found both in the cells of the fructification and in hyphae cultured on agar, raise a number of interesting cytogenetical problems. Two of the most important questions to be answered are (i) what is the genetic constitution of the nuclei in the somatic and sporogenous tissues? and (ii) what is the genetical importance of the nuclear fusion and consequent meiosis in the basidium? Some information on the latter point is available in that LAMBERT (1938) and KLIGMAN (1943) have clearly shown that segregation occurs at meiosis and that nuclei of differing genetic constitution may be involved in the pre-meiotic binucleate condition. Evidence in the same direction has also been obtained in the present investigation through the study of chromosome bridges observed at meiosis. From these observations, it is clear that nuclei of different genetic constitutions must be present in the somatic cells.

The above conclusion leads us to consider the relationship between nuclei of different genotypes within the cells. The maintenance of a genetic equilibrium within and between these multinucleate cells would certainly require a regulating mechanism, as we have shown that cell wall formation and mitosis are not co-ordinated processes. If genetic balance exists between such cells, then the mechanism for its maintenance must be co-ordinated in such a way that cell populations must be phenotypically uniform. The only cytologically observable process which might play a part in maintaining such a genetic equilibrium is the pro-

cess of nuclear migration. However, migration would appear to be too infrequent an event to be of paramount importance for either reducing the nuclear complement of those cells which give rise to the basidia, or for maintaining genetic balance between cells. Evidence from observations on the stability of lines in culture (unpublished data) suggests that a complete state of genetic equilibrium between cells does not exist, in which case it is possible that migration may represent an inefficient method for maintaining genetic uniformity.

SAVILLE (1939) and PINTO-LOPES (1949) have drawn attention to the variety of forms shown by the resting nuclei of a number of different fungi. In the mushroom, we have distinguished between two types of resting nucleus, the non-staining or granular *expanded* type and the densely staining or *homogeneous* form. We have already shown that a real difference exists between these types and that the *homogeneous* nuclei do not represent a particular phase of the mitotic cycle closely associated to the mitotic phase. The difference between these nuclei cannot be a fundamental genetic one as at one particular stage in the development of the basidium the pre-fusion nuclei were all observed to be of the granular *expanded* type. Thus, in spite of the fact that the nuclei which fuse in the basidium can be genetically different, morphologically they are identical.

A clue to the explanation of the differences which exist between these resting nuclei was obtained from a study of the development of the cells of the subhymenium. These cells are physiologically active and in terms of metabolic processes are probably analogous to the egg and pollen mother cells of higher plants. It was found that the two nuclei in the cells of the subhymenium and in the young basidia, were consistently of the *homogeneous* type and that this *homogeneous* condition was usually maintained up until the association of the two nuclei prior to fusion. Shortly before fusion, the nuclei change from the *homogeneous* state to the granular *expanded* condition. Fusion commences when the basidia have enlarged, the enlargement following a period of assimilation of new cell substance which will be made available to the basidiospores. Thus, during the period when the physiological processes connected with increase in cell contents are active, the resting nuclei are in a *homogeneous* state. Further, it has been shown that nuclei of the *homogeneous* resting type preponderate in the cells of the younger mushroom fructifications whereas in the older tissues nuclei of the granular *expanded* type occur more frequently. From this evidence, we may conclude that the presence of nuclei in a *homogeneous* resting condition is associated with centres of pronounced physiological activity. Whether this resting condition is the cause or the result of active metabolism is not known.

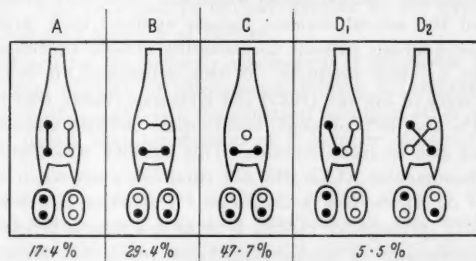
The nuclear membrane of the fusion nucleus in the basidium breaks down at late diakinesis and at this stage the meiotic spindle is formed. Previous workers have reported that this spindle is organised by centrosomes, although COLSON (1935) states that "stages showing the formation of the centrosomes such as those described by WAGER (1894) were not found". It is perhaps significant that in COLSON's excellent diagrams, so-called centrosomes were not seen until the spindle was already organised, and in the present investigation centrosomes were not observed at any stage of mitosis or meiosis. A survey of the literature describing nuclear divisions in fungi in which 'centrosome-like' bodies have been reported has shown that, especially in the case of the *Hymenomycetales*, these 'centrosomes' are only present when the spindle is already organised and, as WAGER (1893) pointed out, "in *Agaricus stercorearius* . . . the two very minute deeply staining granules had no clear border, or radiating striae, . . . and were not always present".

In the cultivated mushroom, overstained basidial cells frequently show spindles which have taken up more stain than the surrounding cytoplasm. In these cells, the concentration of a large number of spindle elements at the poles gives a dot-like appearance at each end of the spindle. A similar phenomenon was observed by SAVILE (1939) in certain rust species where it was shown that the occasional dots observed at the spindle poles were due to an optical effect produced by converging spindle fibres, and these dots were clearly not centrosomes. MCCLINTOCK (1945) and SINGLETON (1953), using the acetocarmine technique, have shown that in *Neurospora crassa* centrosomes are clearly evident. Many other clear examples of centrosomes, especially in Ascomycetes, have been demonstrated, but in the *Basidiomycetes* centrosomes cannot be universal in their occurrence. The work of SAVILE (1939) on the *Uredinales*, the results of the present investigation, and unpublished observations made on *Lycoperdon* spp. and other *Gasteromycetes* have in no instance revealed the presence of centrosomes, and it seems possible that the higher fungi as a group may perhaps be characterised by the absence of such bodies.

Chromosome behaviour at mitosis and meiosis in the mushroom follow well-known patterns and in general show no unique divergence from those associated with the normal nuclear processes of other fungi. The twenty-four chromosomes in the diploid nucleus are always associated as twelve bivalents at meiosis and although the haploid chromosome number of  $n = 12$  is the highest reported for an Autobasidiomycete, no evidence indicating polyploidy was found. The relation of the present chromosome count to the determinations of  $n = 4$  and  $n = 9$  made by earlier investigators has been discussed in a previous publication (EVANS, 1956).

When migration of the nuclei from the basidia to the basidiospores commences, the two nuclei nearest to the sterigmata pass each into a different spore. These nuclei are quickly followed by the nuclei furthest from the sterigmata. Which two of the four nuclei pass into each spore is thus determined by the proximity of the individual nuclei to the sterigmata, and this proximity is itself dependent upon the alignment of the spindles at the second division of meiosis. We have shown that the spindles at the second division of meiosis may be arranged in a variety of ways, the type of alignment in a particular basidium conforming to one of a number of patterns (Table 1). If we disregard for the present, spindles aligned as in type D, it will be seen that only in that type of nuclear division in which the spindles lie parallel to one another and

Table 3. *A diagrammatic representation showing the expected distribution of a gene M (●) and its allele m (○) to the basidiospores when the first division of meiosis is reductional (see text)*



parallel to the long axis of the basidium, i.e. type A, will non-sister nuclei be at the same level with respect to the long axis of the basidium. As the pair of nuclei which are nearest to the sterigmata pass into different spores, in basidia having nuclear divisions of type A, all the basidiospores will contain sister nuclei, whereas basidiospores containing non-sister nuclei will be produced when the spindles are aligned as in types B and C. The spindle alignments shown in type D are merely slight variations of the type A arrangement and ranges between the types D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> shown in Table 3 are found. In the type D class, approximately half of the basidiospores produced will contain sister nuclei, i.e. the D<sub>1</sub> types.

Having determined the relative frequencies of the various classes of spindle alignment, a simple calculation gives us the frequency of basidiospores containing sister nuclei, which in the present material is 20%. This low frequency of basidiospores having sister nuclei has important genetical consequences; e.g. in a diploid nucleus which is heterozygous for two alleles *M* and *m* at a given locus, if the first division

of meiosis is reductional, as for instance would be the case if this locus was near the centromere, then 80% of the basidiospores produced would be heterokaryotic having the constitution  $M/m$ . If, on the other hand, a single cross-over occurs between the centromere and the gene then segregation of these alleles does not take place until the second division of meiosis, so that all the basidiospores produced by type A basidia, 50% of the basidiospores produced by types B and C basidia and 75% of the basidiospores produced by basidia of type D will be heterokaryotic with respect to this locus. Thus, in our material, if segregation of these alleles does not take place until the second division of meiosis, then we should expect 60% of the total basidiospores produced to have the genetic constitution  $M/m$ .

From the above considerations, it may be seen that whenever the fusion nucleus is heterozygous for a given gene, then the arrangement of the spindle at the second division of meiosis ensures that 60 to 80% of the basidiospores contain nuclei which are genetically different. The alignment of the second division meiotic spindles thus tends to perpetuate heterokaryosis without necessitating nuclear exchange between basidiospores or their products. In this connection, it is of interest to note the work of SINDEN (1937) and KLIGMAN (1943), who found that between 20% and 30% of single basidiospore cultures were sterile and did not give rise to fructifications. This sterility was found to be a constant phenomenon which did not diminish even when inbreeding was carried on for several generations. If fertility is determined by heterozygosity (perhaps for mating type as in a simple bipolar system), then the mechanism of spindle alignment which has been described may account for the results of SINDEN and KLIGMAN. The percentage of sterile spores would, on this explanation, be directly related to those spindle alignments which give rise to homokaryotic basidiospores. Further, the retention of the sterility phenomenon, even after continued inbreeding, would be achieved by the presence in each generation of basidia having spindle alignments giving homokaryotic basidiospores.

The above comparison between the breeding results of SINDEN and KLIGMAN and the expected results on the hypothetical system described is very attractive. However, KLIGMAN (1943) attempted to cross sterile mycelia and his results suggest that the breeding system may not be as simple as a two allele bipolar incompatibility mechanism. The question of sexuality, or more correctly incompatibility, in the mushroom is certainly not yet resolved, but from the information available it appears that this fungus may not be a simple homothallic. The present evidence would not be incompatible with the suggestion that the mushroom may be secondary homothallic having a breeding system, on the lines of that described by DODGE (1927 and 1936) for *Neurospora tetrasperma*,



which operates even in the absence of clamp connections or conjugate mitosis.

In connection with the question of incompatibility it is of interest to note that the types of spindle orientation which have been described may be present in other *Hymenomycetes*. If such is the case then variations in spindle orientation might provide a reasonable explanation for the amphithallic nature of some other twospored types (see KENNEDY and BURNETT 1956).

**Acknowledgment.** I am especially grateful to Professor P. T. THOMAS for his stimulating interest and encouragement during the course of this work.

### Summary

1. The number of nuclei found in the hyphal cells was found to vary between 1 and 36, with a mean at  $6.44 \pm 0.08$ . In contrast with this variability the cells of the hymenium were always found to be initially binucleate. This reduction in nuclear number in the hymenial tissue is attributed to a number of factors.

2. Evidence for the heterozygous nature of the fusion nucleus was obtained from a study of chromosome bridges at Anaphase I and II of meiosis. This accords with the genetical results of other investigators who have shown that segregation of a number of factors occurs at meiosis.

3. Clamp connections and conjugate mitotic spindles were not observed although nuclear migration between cells was found to occur. It is suggested that this migration may provide an opportunity for maintaining a genetic balance between cells.

4. It was found that the resting nuclei could attain one of two resting conditions, the *expanded* or the *homogeneous* state, which were characterised by differences in staining affinity. It was shown that the different resting states were not the result of genetical differences between nuclei and did not represent different stages of the mitotic cycle. From observations on the development of the young basidium and on the distribution of these two nuclear types, it is suggested that the difference between the resting nuclei is primarily associated with a difference in cellular activity, the *homogeneous* resting nuclei characterising cells in active metabolic states.

5. The haploid chromosome number was found to be  $n = 12$ , a determination which differs from previously recorded numbers, and the 24 chromosomes of the fusion nucleus regularly formed 12 bivalents at meiosis. The presence of laggard chromosomes at meiosis and mitosis was attributed to sticky adhesions between heterochromatic regions of the chromosomes.

6. Contrary to the reports of previous investigators, centrosomes were not observed at meiosis or mitosis. Observations made on other Basidiomycetes and reports by other investigators suggest that the absence of centrosomes may be a characteristic of the group.

7. Differences in the manner of alignment of the spindles at the second division of meiosis were found between basidia. It was shown that the nuclear constitution of the basidiospores depended upon the type of spindle alignment, and a bias towards the production of spores containing non-sister nuclei was found. It is pointed out that the production of an excess of spores containing non-sister nuclei serves to maintain a high degree of heterokaryosis without involving nuclear exchange between plants.

### References

- ATKINSON, G. F.: The development of *Agaricus campestris*. Bot. Gaz. **42**, 241—264. (1906).
- CAYLEY, D.: Spores and spore germination in wild and cultivated mushrooms. Trans. Brit. mycol. Soc. **20**, 225—241 (1936). — Experimental spawn and mushroom culture. Ann. appl. Biol. **24**, 311—322 (1937). — Experimental spawn and mushroom culture. II. Artificial composts. Ann. appl. Biol. **25**, 322—340 (1938).
- COLSON, B.: The cytology of the mushroom *Psalliota campestris*, Quel. Ann. Bot. **49**, 1—18. (1935).
- DARLINGTON, C. D., and L. F. LA COUR: The handling of chromosomes. London: Allen & Unwin, Ltd. 1947.
- DODGE, B. O.: Nuclear phenomena associated with heterothallism and homothallism in the ascomycete *Neurospora*. J. Agr. Res. **35**, 289—305 (1927). — Facultative and obligative heterothallism in Ascomycetes. Mycologia **28**, 339—409 (1936).
- EVANS, H. J.: Chromosomes of the cultivated mushroom. Nature (Lond.) **178**, 1005—1006 (1956).
- GWYNNE-VAUGHAN, H. C. I., and B. BARNES: The structure and development of the fungi, 2nd ed., p. 2. Cambridge: Cambridge Univ. Press 1937.
- HEIN, I.: Studies on the mycelium of *Psalliota campestris*. Amer. J. Bot. **17**, 197—211 (1930).
- HIRMER, M.: Zur Kenntnis der Vielkernigkeit der Autobasidiomyceten. I. Z. Bot. **12**, 657—674 (1920).
- HUSKINS, C. L., and L. M. STEINITZ: The nucleus in differentiation and development. II. Induced mitosis in differentiated tissues of *Rhoeo* roots. J. Hered. **39**, 67—77 (1948).
- KENNEDY, E. M., and J. H. BURNETT: Amphithallism in fungi. Nature (Lond.) **177**, 882—883 (1956).
- KLIGMAN, A. M.: Some cultural and genetic problems in the cultivation of the mushroom *Agaricus campestris*, Fr. Amer. J. Bot. **30**, 745—762 (1943).
- KLOUSHNIKOVA, E. S.: The wild *Psalliota campestris*, its sexual character and its relation to the cultivated mushroom. Bull. Soc. Nat. Moscow, N.S. **48**, 53—58 (1939).
- LAMBERT, E. B.: Principles and problems of mushroom culture. Bot. Rev. **4**, 397—426 (1938).

- LEVINE, M.: The origin and development of lamellae in *Agaricus campestris* and in certain species of *Coprinus*. Amer. J. Bot. 9, 509—533 (1922).
- MAIRE, R.: Recherches cytologiques et taxonomiques sur les basidiomycètes. Bull. Soc. mycol. France 18, Suppl. 1—209 (1902).
- McCLINTOCK, B.: *Neurospora*. I. Preliminary observations on the chromosomes of *Neurospora crassa*. Amer. J. Bot. 32, 671—678 (1945).
- PINTO-LOPES, J.: Contribution to the study of the nuclear structure in fungi. Portug. Acta Biol., Sér A 2, 191—210 (1949).
- POLLISTER, A. W., and C. LEUCHTENBERGER: The nature of the specificity of methyl green for chromatin. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 35, 111—116 (1949).
- SARAZIN, A.: Evolution nucléaire de la baside et des basidiospores dans *Agaricus campestris* (var. cultivée). C. R. Acad. Sci. (Paris) 206, 275—278 (1938). — Cultures monosperme d'*Agaricus campestris* (var cultivée). C. R. Acad. Sci. (Paris) 208, 2015—2017 (1939).
- SASS, J. E.: A cytological study of the bispored *Psalliota campestris*. Pap. Mich. Acad. Sci. Arts and Letts. 9, 287—298 (1928). — Cytology of spore germination in the bispored form of *Psalliota campestris*. Mycologia 28, 431—432 (1936).
- SAVILE, D. B. O.: Nuclear structure and behaviour in species of the *Uredinales*. Amer. J. Bot. 26, 585—609 (1939).
- SINDEN, J. W.: Zit. KLIGMAN 1943.
- SINGLETON, J. R.: Chromosome morphology and the chromosome cycle in the ascus of *Neurospora crassa*. Amer. J. Bot. 40, 124—144 (1953).
- STOLLER, B. B.: Principles and practice of mushroom culture. Economic Bot. 8, 48—95 (1954).
- TRESCHOW, C.: Nutrition of the cultivated mushroom. Dansk bot. Ark. 11, 1—180 (1944).
- WAGER, H.: On nuclear divisions in the *Hymenomycetes*. Ann. Bot. 7, 489—514 (1893). — On the presence of centrospheres in fungi. Ann. Bot. 8, 321—334 (1894).

Dr. H. J. EVANS, M. R. C. Radiobiological Research Unit,  
Atomic Energy Research Establishment,  
Harwell, Didcot, Berks., England

From the Botany Department, Panjab University, Amritsar, India  
**CYTOLOGY OF THE AUTOTRIPLOID ALLIUM RUBELLUM**

By

T. N. KHOSHOO and V. B. SHARMA

With 9 Figures in the Text

(Eingegangen am 10. November 1958)

**A. Introduction**

*A. rubellum* BIEB. is distributed from North-Western India to Ural, Cacausia and Siberia. In India the species grows in the Punjab and Western Himalayas, extending from Kashmir to Kumaon. It grows from an altitude of 1500 to 8000 ft. (cf. HOOKER 1894). Earlier this species has been studied cytologically by LEVAN (1931), who reported it to be a diploid ( $2n = 16$ ). LEVAN obtained his material from Hortus Bergianus (Stockholm), but its exact place of origin has not been mentioned.

The present material was collected from Pathankot (alt. 1000 ft.), where it grows more or less as a weed in wheat fields. Same cytological procedures were used as in *A. neapolitanum* CYR. (KHOSHOO and SHARMA 1958). Voucher specimens have been deposited in the Herbaria of the Forest Research Institute (Dehra Dun) and Botany Department, Panjab University (Amritsar).

**B. Karyotype**

Twenty-four chromosomes were counted in the root-tip cells of the Pathankot population (Fig. 1). The chromosomes are either with a median or a sub-median centromere and there are no well-marked size differences within the karyotype. Six chromosomes are secondarily constricted. Of these, in four (Figs. 1 and 2a—c, e) the secondary constriction is quite near the centromere. The remaining two chromosomes (Figs. 1 and 2d, f) have a secondary constriction situated medially in one of the arms. All these six chromosomes (Fig. 2), differ not only in their length, but also in the size of the distal segment, separated by the secondary constriction. Strictly speaking, these six chromosomes cannot be arranged into three pairs, because no two chromosomes are absolutely morphologically homologous except perhaps 'a' and 'b' (Fig. 2). This point was confirmed from eight metaphase plates.

**C. Meiosis**

The earliest stage available was metaphase-I. Chromosome associations in 16 exceptionally clear pollen-mother-cells have been given in Table 1.

As is evident, metaphase-I is conspicuous by the presence of quadri-valents, trivalents, bivalents and univalents. In only 31% of the cells a quadrivalent was seen (Fig. 3). More than one quadrivalent was never observed in a cell. However, all cells were characterised by the presence

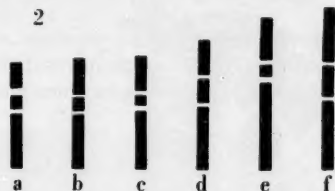


Fig. 1.  $2n = 24$ . All chromosomes have median or submedian kinetochores. Six possess secondary constrictions

Fig. 2. Idiogram of the 6 nucleolar chromosomes.  
Both figures  $\times 888$

of trivalents (Figs. 3—5). In about 19% of the cells the number of trivalents was 8, which is the maximum possible (Fig. 4). The minimum number of trivalents observed was 5. Bivalents were seen in about 62% of the cells. The maximum number of bivalents is 4, while the minimum is one (Fig. 3). Univalents were seen in about 56% of the cells; the

Table 1. *Chromosome associations at metaphase-I*

	Combinations observed									Total number	Average number per cell
Quadrivalents . . . . .	1	1	1	—	—	—	—	—	—	5	0.3125
Trivalents . . . . .	6	5	4	8	7	6	6	5	5	99	6.1875
Bivalents . . . . .	1	2	4	—	1	3	2	4	3	29	1.8125
Univalents . . . . .	—	1	—	—	1	—	2	1	3	9	0.5625
Number of cells . . . .	3	1	1	3	2	3	1	1	1	16	

maximum number being 3, while the minimum being just one. The univalents were conspicuous by lying outside the metaphase plate (Fig. 5).

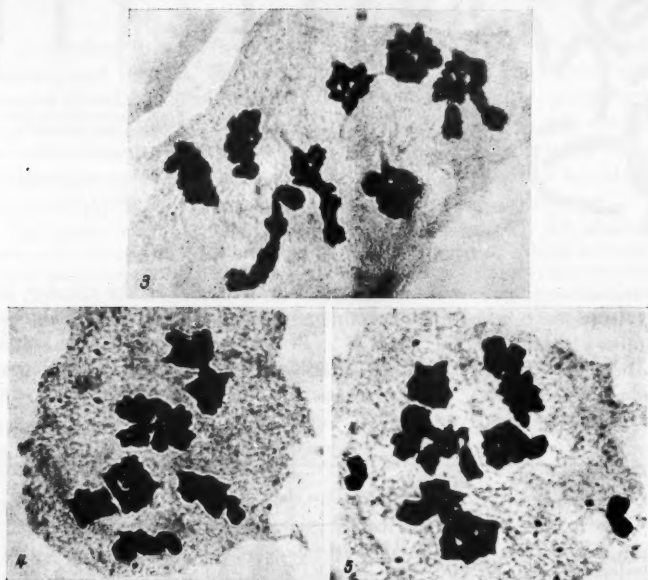
The distribution of chromosomes at anaphase-I is irregular and often the number of chromosomes at each pole cannot be counted properly. An analysis of 28 absolutely clear cells is given in Table 2.

As is evident, the chromosome number at the poles varies from 8 to 16; furthermore, this stage is characterised by one or two lagging

Table 2. *Distribution at anaphase-I*

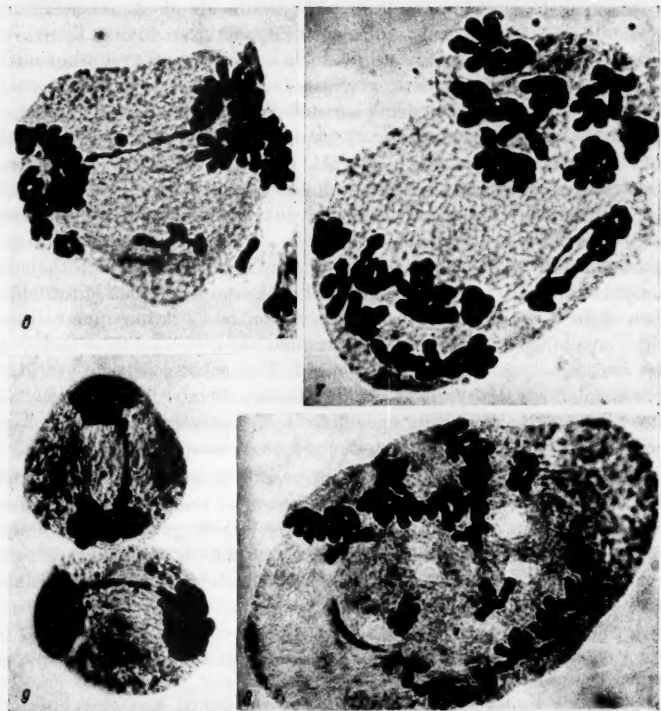
Distribution	16 — 8	15 — 9	14 — 10	14 1 9	13 1 10	13 1 <sub>II</sub> 9	12 — 12	12 1 11	12 1 <sub>II</sub> 10
Number of cells	2	7	3	2	1	1	4	7	1

univalents (Figs. 6—8). In some cells the univalents are in a process of division (Fig. 6) or have divided (Fig. 8), while in others the univalents may lag and ultimately may form micronuclei. About 25% of the cells show

Figs. 3—5. Metaphase-I. 3, 1<sub>IV</sub> + 6<sub>III</sub> + 1<sub>II</sub> 4, 8<sub>III</sub>. 5, 6<sub>III</sub> + 2<sub>II</sub> + 2<sub>I</sub>.  $\times 1400$ 

bridges with or without fragments. Out of these, nearly 16.67% have a bridge with a fragment (Fig. 6). The fragment is invariably small in size. However, in 8.33% of the cells, bridges without fragments were seen (Fig. 8). Fig. 7 shows a 10:12 distribution accompanied by a bridge formed by a bivalent in which case no fragment has been released so far. On average 0.285 bridges were seen in a cell. The bridges tear ultimately at one or two points, often leaving a long thin chromatin thread in the middle. The bridge-fragment configurations evidently indicate structural differences between the pairing chromosomes, and bridges

without fragments possibly also indicate that the pairing chromosomes are not completely homologous (cf. DARLINGTON 1938, ÅKERMAN and HAGBERG 1954, MURTY and SWAMINATHAN 1956), resulting in delay in disjunction.



Figs. 6—8. Anaphase-I. 6, Bridge-fragment configuration and one univalent in division. 7, 10: 1<sub>II</sub>: 12. The bivalent has formed a dicentric bridge. 8, Bridge without fragment and divided univalents.  $\times 1400$

Fig. 9. Telophase-II with a bridge-fragment configuration in each of the dyad cells.  $\times 1400$

At telophase there are organized two equal or unequal nuclei accompanied by one or two micronuclei. No bridges were seen to persist till this stage.

Metaphase-II was organized normally but was accompanied by 1 to 2 micronuclei, which remain on one side of the metaphase plate. As expected, anaphase-II was abnormal. Only one cell could be analysed at this stage and in this cell 11 or 12 chromatids were counted at a pole,



accompanied by lagging chromosomes or chromatids. From 0 to 3 micronuclei were observed. At this stage bridges were also found. On the average 0.147 bridges were present per cell. This is approximately half of the number found at anaphase-I. The occurrence of the rare bridges at anaphase-II, therefore, appears to be the result of chance inclusion of the dicentric chromosomes in one of the dyad nuclei. In fact, there is a chance of 50% for a bridge to be oriented in a manner, so that it is included undivided in a dyad nucleus at anaphase-I. In all such cases (except one) there were observed no fragments associated with the bridges at anaphase-II. In the exceptional case (Fig. 9) there was a bridge in each of the dyad cells accompanied by a fragment. This could be explained if we assume that at anaphase-I there was irregular segregation of trivalents or quadrivalents, resulting in 2 complete bivalents moving as such, one each to a pole. Furthermore, if the two chromosomes of each of these bivalents differ by an inversion, one could reasonably expect that at anaphase-II there would be the typical bridge-fragment configuration in each of the dyad cells (Fig. 9). An alternative, and a rather more reasonable, possibility is that the two dicentric chromosomes were included one each in a dyad nucleus at anaphase-I. This could easily happen if in a bivalent there were formed three chiasmata (two within a paracentric inversion and one outside it) as depicted by SWANSON (1958, p. 169). The resulting dicentrics would organise bridges at anaphase-II.

At telophase-II, tetrads with apparently equal or unequal nuclei were organised. In rare cases, triads have also been seen. The pollen grains are variable in size. The size of the largest grains is  $10.8 \times 9 \mu$  and that of the smallest grains is  $3 \times 4.5 \mu$ . Only 34–40% pollen grains are stainable; about 42% are without micronuclei, while 58% of the pollen grains contain 1–3 micronuclei.

Small, shrunken seeds have been harvested and their viability is yet to be tested; however, field observations reveal, that the species is mostly propagated by vegetative means.

#### D. Discussion

The details of the karyotype of the diploid reported by LEVAN (1931) are not given, and therefore no comparison of the diploid race can be made with the triploid Pathankot population. In the latter there are six nucleolar chromosomes, which perhaps represent three pairs of the three different genomes involved in its origin. Evidently, on karyotypic grounds, the triploid does not represent a case of absolutely true autopolyploidy, and hybridity seems to be involved in its origin. That such a karyotype could have arisen only by secondary changes, appears to be far-fetched. It must, however, be admitted that karyotypic analysis alone may be rather a misleading criterion for diagnosis of the nature

of the polyploidy (STEBBINS 1950), primarily because the similarity in the karyotypes cannot be used as an index of genic homology between the chromosomes.

The meiosis of this taxon is characterized by a high frequency of multivalents, as stated above. The multivalent pairing is primarily a question of homology rather than the length of the chromosomes, because there are at least four triploid *Allium* hybrids which have about as long chromosomes but show bivalents and univalents at meiosis (cf. CLARK and MCKAY 1946, JONES and KEHR 1957). It is, therefore, clear that the high frequency of trivalent formation in the present case indicates a very high degree of homology between the chromosomes of the three genomes. It may, therefore, be logically concluded that this taxon is either an autopolyploid or a segmental-allopolyploid. Experience has shown that bivalent formation alone is not a safe criterion for diagnosing the nature of polyploidy. On the other hand, multivalent formation in a polyploid is the result of the homology between the parental chromosomes, and as such, ordinarily indicates only auto- or segmental-allopolyploidy. This point is in favour of the above conclusion.

It is, indeed, extremely difficult to distinguish between these two categories (auto- or segmental-allopolyploidy) of polyploids, until a thorough systematic and experimental work is undertaken (cf. STEBBINS 1947, 1950). Till then, all conclusions would be of a tentative nature. However, chiefly on cytological grounds (which, though "valuable", are by no means "infallible"), one would ordinarily expect a much higher frequency of multivalents in autopolyploids in comparison to segmental-allopolyploids. On this reasoning the Pathankot population of *A. rubellum* appears to be autotriploid. Keeping in view the karyotypic heterozygosity, it is rather tempting to suggest that the taxon may very well be an intervarietal autopolyploid, and it is possible that there may be different chromosomal biotypes at the diploid level. The presence of bridges during the meiosis corroborates this assumption. Here it is pertinent to mention that intervarietal autopolyploids are suspected in the genus *Allium*, particularly in *A. schoenoprasum*, *A. carinatum* and *A. oleraceum* (STEBBINS 1947, 1950; cf. also LEVAN 1931, 1936). In the autotriploids reported in these species, there has also been noted a high frequency of trivalent formation as is true in the present case.

To date no diploid forms of this species have been discovered in North-Western India, but search is being continued in this area. It may, however, be mentioned that the only allied species of *A. rubellum*, as indicated by HOOKER (1894), is *A. lilacinum* ROYLE. On the basis of morphological and karyotypic comparisons, it can be safely said that *A. lilacinum* (unpublished data) could not have been involved in the origin of the triploid *A. rubellum*. Furthermore, HOOKER (1894) recognizes

two varieties within *A. rubellum* itself, and the present taxon is perhaps var. *parviflora* LEDEB., because the flowers are small. The other variety, *grandiflora* BOISS., may very well be diploid, since its flowers are reported to be larger, as is also the case in the allied diploid species *A. lilacinum* studied by the writers. The possibility of var. *grandiflora* being involved in the origin of the present autotriploid is being examined and further systematic and geographic studies are in progress.

Whatever the nature of the polyploidy and the mode of its origin, the present taxon has been preserved in nature in spite of its extreme sterility. It shows efficient vegetative reproduction, since a single plant produces 3—6 bulbs each season. As mentioned above, it is extremely common and is more or less a weed, in the wheat fields at Pathankot. In such habitats its spread seems to be aided inadvertently through ploughing. Thereby, a cluster of bulbs formed by a single plant becomes separated into individual bulbs. Plants of this species are also met with in nearby waste ground in the shade of bushes, but here these are by no means common.

### Summary

Of *A. rubellum*, already known as a diploid ( $2n = 16$ ), a triploid form has been collected from Pathankot. All the 24 chromosomes in the latter possess median to submedian kinetochores. Of these, 6 are nucleolar chromosomes, which do not represent 3 truly morphologically homologous pairs.

Meiosis is characterised by the presence of quadrivalents, trivalents, bivalents and univalents. Out of these, trivalents are the most common and often as many as 8 were seen in a cell. Anaphase-I distribution is irregular and shows bridge-fragment configurations, lagging chromosomes and micronuclei. The subsequent course of meiosis is also not normal and results in sterility.

In view of the high frequency of trivalents, the triploid form appears to be an autotriploid and the karyotypic heterozygosity points to an intervarietal origin. It maintains itself because of the efficient vegetative reproduction.

**Acknowledgments.** We are deeply grateful to Prof. P. N. MEHRA for granting us facilities for work, encouragement and helpful suggestions. To Mr. R. S. PANTHANIA we are indebted for taking the photographs illustrating this paper.

### References

- ÅKERMAN, A., and A. HAGBERG: Interspecific sterility in oats. *Hereditas* (Lund) **40**, 438—452 (1954).  
CLARK, A. E., and H. K. MCKAY: Cytological study of some triploid onion plants. *J. Hered.* **37**, 130—136 (1946).

- DARLINGTON, C. D.: Chromosome behaviour and structural hybridity in *Tradescantia*. II. J. Genet. 35, 259—280 (1938).
- HOOKE, J. D.: The flora of British India. Vol. 6, (1894).
- JONES, S. T., and A. E. KEHR: Cytology and plant characteristics of an amphidiploid derived from *A. ascalonicum* and *A. fistulosum*. Amer. J. Bot. 44, 523—529 (1957).
- KHOSHOO, T. N., and V. B. SHARMA: Cytology of the pentaploid *Allium neapolitanum*. Cytologia (Tokyo) 23 (in the press 1958).
- LEVAN, A.: Cytological studies in *Allium*. A preliminary note. Hereditas (Lund) 15, 347—356 (1931). — Zytologische Studien an *Allium schoenoprasum*. Hereditas (Lund) 22, 1—128 (1936). — Cytological studies in the *Allium paniculatum* group. Hereditas (Lund) 23, 317—370 (1937).
- MURTY, R. B., and M. S. SWAMINATHAN: Intraspecific differentiation in *Nicotiana tabacum*. Indian J. Genet. and Plant Breed. 16, 88—97 (1956).
- STEBBINS, jr. G. L.: Types of polyploids: Their classification and significance. Advanc. Genet. 1, 403—429 (1947). — Variation and evolution in plants. New York 1950.
- SWANSON, C. P.: Cytology and Cytogenetics. London 1958.

Dr. T. N. KHOSHOO and V. B. SHARMA  
Botany Department, Panjab University,  
P. O. Khalsa College, Amritsar, India

Aus dem Institut für Kulturpflanzenforschung  
der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin in Gatersleben  
und dem Institut für Genetik der Martin-Luther-Universität Halle

## ÜBER DAS VERHALTEN EINES RINGCHROMOSOMS IN DER MITOSE UND MEIOSE VON ANTIRRHINUM MAJUS L.

Von

ARND MICHAELIS

Mit 13 Textabbildungen

(Eingegangen am 12. Dezember 1958)

### I. Einleitung

In verschiedener Hinsicht sind Individuen mit einem oder mehreren ringförmig geschlossenen Chromosomen im sonst normalen Karyotyp besonders geeignete Objekte für cytogenetische Untersuchungen, da sie Hinweise über die Art und Häufigkeit der Austauschvorgänge im Verlauf der Reduktionsteilungen geben können. Über das Meioseverhalten spontan aufgetretener oder experimentell induzierter Ringchromosomen bei verschiedenen Objekten wurde schon mehrfach berichtet. So liegen Untersuchungen über das Verhalten von Ringchromosomen in der Mitose von *Crepis* (NAWASCHIN 1930), *Zea* (McCLINTOCK 1932, 1938, 1941) und *Nicotiana* (STINO 1940) vor. Über die Entstehung von Ringchromosomen in der Meiose von *Tulipa* und *Tradescantia* berichteten UPCOTT (1937) und GILES (1940). Bei *Drosophila* wurden die mit dem Auftreten eines ringförmig geschlossenen X-Chromosoms verbundenen Konsequenzen von MORGAN (1933), STURTEVANT und BEADLE (1936), BATTACHARYA (1950), SCHULTZ und CATCHESIDE (1937), BRAVER und BLOUNT (1950) und BROWN und HANNAH (1952) untersucht. LEVAN (1956) fand Ringchromosomen in menschlichen Tumoren. Ausführliche Untersuchungen über die Cytologie eines durch Röntgenbestrahlung entstandenen, ringförmig geschlossenen Chromosoms (6) beim Mais führte SCHWARTZ (1953, 1954, 1955) durch. Ein dem letztgenannten sehr ähnliches Verhalten zeigte ein spontan aufgetretenes Ringchromosom bei *Antirrhinum majus*, über das im folgenden berichtet werden soll.

### II. Material und Methodik

Aus einer im Zusammenhang mit der Bearbeitung der Mutante „Angusta“ (MICHAELIS 1959) aufgezogenen Einzelpflanzennachkommen-schaft wurden 1954 5 Pflanzen ausgelesen, die durch geringe Vitalität und etwas schmalere Blätter auffielen. Die cytologische Analyse ergab einen Karyotyp mit 15 stabförmigen und einem ringförmig geschlossenen Chromosom. Die Blüten zeigten in Größe und Ausfärbung keine

wahrnehmbaren Unterschiede gegenüber normalen Pflanzen. Auf den Blättern traten häufig sehr schmale hellere Streifen, Flecke und leichte Deformationen auf.

Diese Abnormitäten waren jedoch so geringfügig, daß sie erst bei genauer Betrachtung augenfällig wurden und nicht ausreichten, um die betreffenden Pflanzen mit Sicherheit phänotypisch zu klassifizieren. Die phänotypische Beurteilung bedurfte stets einer Bestätigung durch eine Analyse des Karyotyps.

Blütenblätter und Antheren wurden aus 1–3 mm langen Knospen in Alkohol-Eisessig 3:1 fixiert, mit Eisenkarminessigsäure gefärbt und zu Quetschpräparaten verarbeitet. Aus einem Teil der Präparate konnten über Trockeneis-Alkohol Dauerpräparate hergestellt werden (CONGER und FAIRCHILD 1953). Für die mikroskopischen Untersuchungen stand ein Zeiss-Lumipan zur Verfügung. Die Mikrophotogramme wurden mit der Zeiss-Miflex auf Agfa-Isopan-FF-Kleinbildfilm angefertigt und 2000fach vergrößert.

### III. Ergebnisse

#### 1. Die Mitose

Bei den Untersuchungen der Mitose in den Blütenblättern wurden in allen Zellen 15 stabförmige und ein zu einem Ring geschlossenes

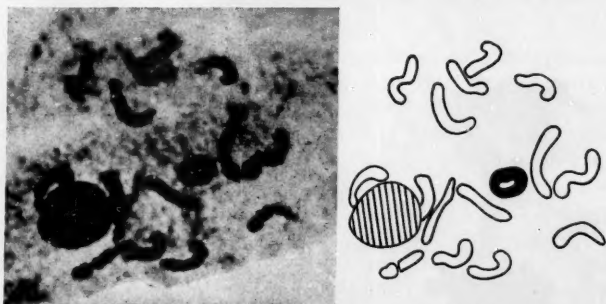


Abb. 1. Chromosomenbestand in der Prophase einer Pflanze mit 15 stabförmigen und einem Ringchromosom. 2000 x

Chromosom gefunden (Abb. 1). In den Anaphasen traten in 26,1% aller auswertbaren Zellen Anaphasebrücken auf (Tabelle 1).

Nach MCCLINTOCK (1938) ist diese Brückenbildung nur durch die Annahme erklärbar, daß durch einen somatischen Austauschvorgang zwischen den Chromatiden („reziproke Schwesterchromatidentranslokation“) des Ringchromosoms in der in Abb. 4a dargestellten Weise doppeltgroße Ringe entstehen. In dem vorliegenden Material wurden derartige Ringkonfigurationen in 14% der untersuchten Zellen gefunden (Abb. 2, 3). 12,1% der Anaphasebrücken bestanden aus Schwester-ringchromosomen, die ineinander verschlungen waren (Abb. 3 rechts)

Solche Konfigurationen können nach einem doppelten bzw. jedem geradzahigen somatischen Austauschvorgang in Ringchromosomen erwartet werden (Abb. 4b).

Tabelle 1. Die Häufigkeit von Brückenkonfigurationen in der mitotischen Anaphase

	Ohne Brücke	Doppelt- große, diz. Brücke	Ver- schlungene Ringe	Gesamt
H 1	56	10	7	73
H 3	31	5	4	40
H 4	66	14	14	94
Gesamt	153	29	25	207
Prozent	73,9	14	12,1	100

26,1

LEVAN (1956) fand in den von ihm untersuchten Tumoren ähnliche Anaphasebrückentypen und deutete sie auf die gleiche Weise. Der in dem vorliegenden Material gefundene Prozentsatz an Brücken ist unerwartet hoch; er liegt beim Mais für das

ringförmig geschlossene 2. Chromosom nach McCLINTOCK mit 8% und für das 6. Chromosom (SCHWARTZ 1953) mit 4,5% bedeutend niedriger.

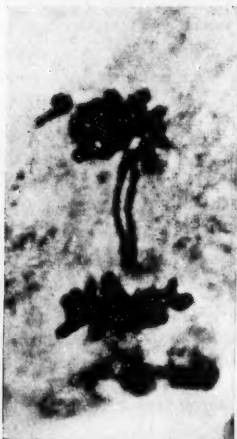


Abb. 2



Abb. 3

Abb. 2 u. 3. Anaphasestadien. Abb. 2. Anaphase mit doppeltgroßer dizentrischer Brücke. Abb. 3. Anaphase aus einer polyploiden Tapetenzelle, links: doppeltgroße dizentrische Brücke, rechts: verschlungene („interlocked“) Ringe. 2000  $\times$

Da anzunehmen ist, daß eine derartige Brücke nicht immer an den Stellen reißt, an denen der Austausch stattgefunden hat, so ergibt sich, je nachdem an welchem Ort der Reiß eintritt, eine ungleichmäßige Ver-



teilung des genetischen Materials auf die Tochterzellen, d.h., es entstehen Zellen mit Duplikationen bzw. Deletionen. Dieser Vorgang erklärt auch die morphologischen Abnormitäten auf den Blättern der betreffenden Pflanzen, die damit ein durch somatische Chromosomenmutationen hervorgerufenen Fleckenmosaik darstellen:

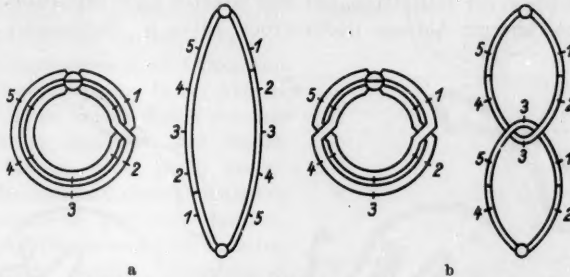


Abb. 4a u. b. Die Entstehungsweise verschiedener Anaphasekonfigurationen durch Austauschvorgänge im somatischen Gewebe. a Doppeltgroßer dizentrischer Ring. b Verschlungene Ringe

## 2. Die Meiose

Aus den Untersuchungen des Meioseablaufs in „Ringpflanzen“ können sich wichtige Folgerungen über Anlage, Häufigkeit und Art der Austauschvorgänge ergeben, da sich aus den zu erwartenden unterschiedlichen Anaphase I- und Anaphase II-Konfigurationen Rückschlüsse auf die Chiasmaanlage im Ring-Stab-Bivalent machen lassen.

Im Pachytän der 5 Ausgangspflanzen treten das Ringchromosom und sein stabförmiger Partner lückenlos gepaart auf (Abb. 5). Unter der großen Anzahl untersuchter Ringpaarungsverbindungen wurden nur wenige gefunden, bei denen sehr kurze, überstehende Enden zu sehen waren. Die überwiegende Mehrzahl zeigte vollständig gepaarte Ring-Stabverbände ohne univalente Abschnitte. Die gleiche Feststellung gilt für Pflanzen mit Ringchromosomen aus der Nachkommenschaft der 5 Ausgangspflanzen. Diese Tatsache und das Fehlen deutlicherer phänotypischer Unterschiede gegenüber normalen Pflanzen, die bei Verlust größerer Chromosomenabschnitte mit Sicherheit zu erwarten wären (sofern ein solcher Genotyp überhaupt noch lebensfähig ist), zeigen, daß das betreffende Chromosom fast mit seiner gesamten Länge an der Ringbildung beteiligt ist. Da nach den allgemein gültigen Vorstellungen eine irreversible Verbindung von Chromosomenenden nur dann auftreten kann, wenn ein Verlust oder eine Beschädigung der Telomeren erfolgt ist, könnte es sich im vorliegenden Falle um den Verlust von zwei sehr kurzen Endsegmenten handeln, wonach durch Reunion der Bruchflächen das Ringchromosom aus einem stabförmigen entstanden ist.

MECHELKE (1951) fand in einer Wurzelspitzenzelle eines triploiden Gerstenkeimlings ein Ringchromosom mit einem zugehörigen Fragment und sieht nach seinen Befunden für die Entstehung 2 Möglichkeiten. So könnte dieser Ring entweder durch Brüche an beiden Enden des in Frage kommenden Chromosoms oder durch Bruch nur nahe einem Ende und Reunion der Bruchfläche mit dem intakten Ende entstanden sein. Befunde anderer Autoren (McCLINTOCK 1941a, b; DARLINGTON und

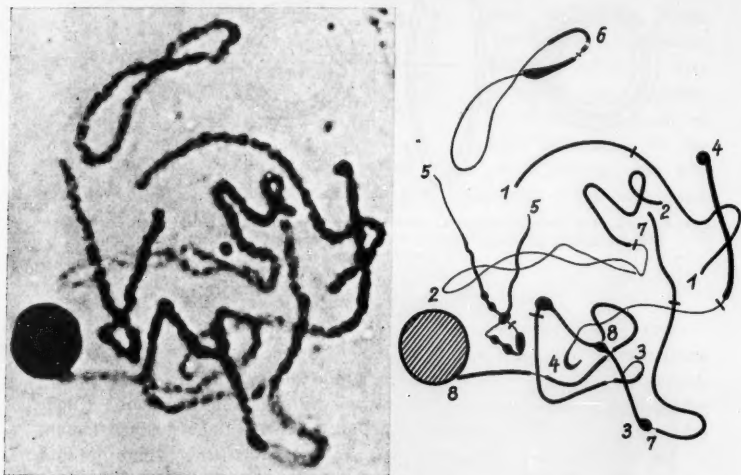


Abb. 5. Pachytan in einer Pflanze mit 15 stabförmigen und 1 Ringchromosom.  
2400 x

UPCOTT 1941; DARLINGTON und LA COUR 1945 u. a.) machen die erstgenannte Möglichkeit wahrscheinlicher.

Eine von GILES (1941) für die Entstehung von Ringen aus einer univalenten Paarungskonfiguration in triploiden *Tradescantia*-Hybriden postulierte Möglichkeit könnte auch für *A. majus* Gültigkeit haben, zumal RIEGER (1957) derartige Paarungskonfigurationen bei haploiden Formen von *A. majus* beschrieben hat. Voraussetzung dafür wäre für den vorliegenden Fall ein Chromosom, das an beiden Chromosomenarmenden relativ zum Centromer invertierte, homologe Abschnitte hat. Eine in der Abb. 6 schematisch dargestellte In-sich-Paarung mit Austausch zwischen den homologen Segmenten könnte dann auftreten, wenn entweder zwischen dem betreffenden Chromosomenpaar zufällig Asynapsis erfolgt oder der homologe Partner infolge eines Non-Disjunction in den prämeiotischen Teilungen und daraus resultierender 17:15-

Verteilung in einer PMZ fehlt und damit das betreffende Chromosom univalent vorliegt.

Durch den Vergleich einer Anzahl von Pachytänen, in denen alle 8 Bivalente zu identifizieren waren, mit Pachytänen von Sippe 50 konnte das Ringchromosom als Chromosom 6 bestimmt werden. In der Abb. 5a sind die zu beiden Seiten der Einschnürung liegenden, sich stärker anfärbenden, etwa gleich großen für Chromosom 6 charakteristischen Chromomeren gut zu erkennen, während Chromosom 5 durch unterschiedlich große Chromomeren gekennzeichnet ist, von denen besonders eine proximal der Insertionsstelle lokalisierte auffällt. In dieser Abbildung kommen auch die „diffusen Enden“ von Chromosom 2, die sich durch geringe Paarungsaffinität auszeichnen, besonders gut zur Geltung.

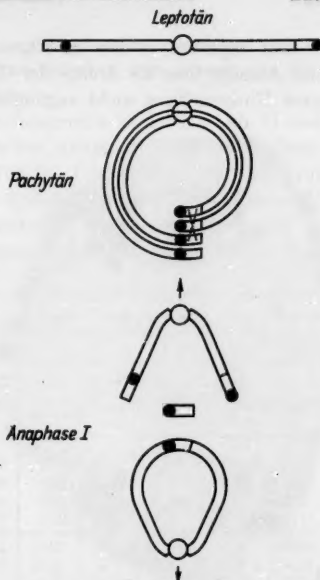


Abb. 6. Schematische Darstellung der möglichen Entstehungsweise eines Ringchromosoms

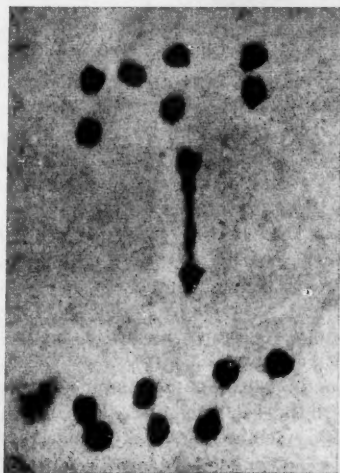


Abb. 7



Abb. 8

Abb. 7 u. 8. Anaphasekonfigurationen der Meiose I. Abb. 7. Einfachbrücke in A I.  
Abb. 8. Doppelbrücke in A I

Das Diplotän, in dem im allgemeinen die erste Möglichkeit besteht, eine Aussage über die Anlage der Chiasmata zu machen, ist bei *A. majus* einer Untersuchung nicht zugänglich. Es wurde von ERNST (1938) als

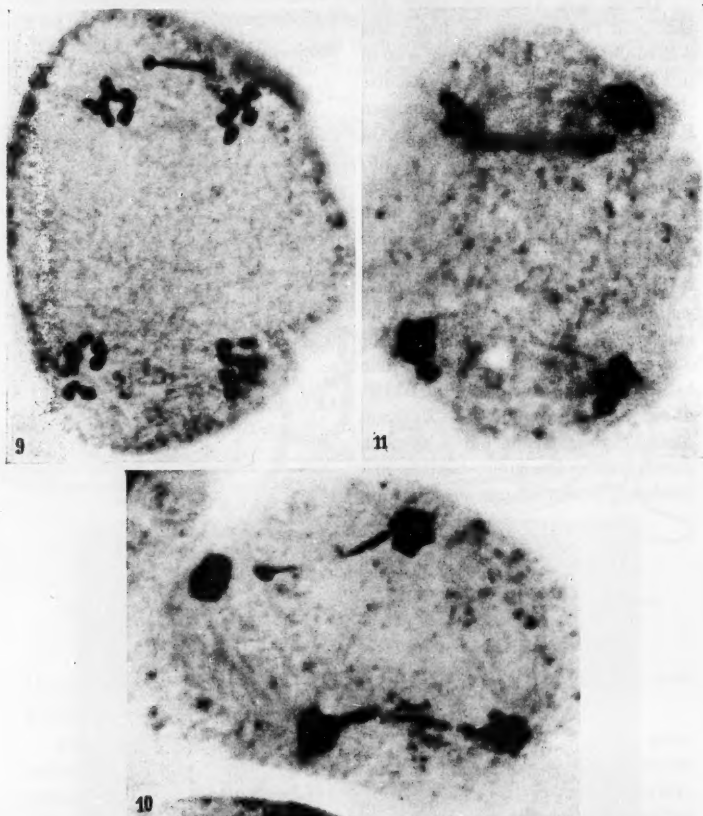


Abb. 9—11. Anaphasekonfigurationen der Meiose II. Abb. 9. Einfachbrücke in A II.  
Abb. 10. Zwei Einfachbrücken in A II. Abb. 11. Doppelbrücke in A II

„Diffusstadium“ beschrieben und ist dadurch gekennzeichnet, daß die Färbbarkeit des Chromatins stark nachläßt und sich auf einzelne stärker färbare Bröckchen unregelmäßiger Form beschränkt, die durch diffuse Stränge miteinander verbunden sind. In der Diakinese findet sich das Ringchromosom stets als Paarungsverband mit seinem stab-

förmigen, homologen Partner. In diesem Stadium ist allerdings, ebenso wie in der Metaphase I, das Ring-Stab-Bivalent nur schwer von den übrigen 7 Bivalenten zu unterscheiden.

In der Anaphase I wurden erwartungsgemäß Einfach- (Abb. 7) und Doppelbrücken (Abb. 8) gefunden; in der Anaphase II traten Einfachbrücken innerhalb einer Spindel (Abb. 9), beider Spindeln (Abb. 10) oder Doppelbrücken innerhalb einer Spindel (Abb. 11) auf. Eventuell zu diesen Brücken gehörige Fragmente als Folge von Austausch in heterozygoten, parazentrischen Inversionen konnten in keinem Fall

Tabelle 2. Experimentell ermittelte Werte für die Häufigkeit verschiedener Anaphasekonfigurationen in der Anaphase I und Ana-Telophase II der Meiose in Ringpflanzen

Pflanzen-Nr.	A I				A II				
	Ein-fach-brücke	Dop-pel-brücke	Ohne Brücke	Ins-gesamt	Ein-fach-brücke	2 Ein-fach-brücken	Dop-pel-brücke	Ohne Brücke	Ins-gesamt
H 1	1567	39	1346	2952	927	219	16	1059	2221
H 3	78	5	53	136	258	29	8	276	571
H 5	121	5	108	234	194	34	6	173	407
H 8	237	12	173	422	189	36	8	218	451
Gesamtanzahl	2003	61	1680	3744	1568	318	38	1726	3650
Prozent	53,5	1,6	44,9	100,0	43,0	8,7	1,0	47,3	100,0
SCHWARTZ 1953 (Mais)									
Prozent	59	13	28	100	35	—	10	55	100

nachgewiesen werden. Die Häufigkeiten der in den untersuchten Pflanzen gefundenen verschiedenen Anaphasekonfigurationen sind in der Tabelle 2 zusammengefaßt. Sie wurden aus PMZ von 4 Ausgangspflanzen gewonnen und zeigen eine gute Übereinstimmung. Auf die sich aus dem Zahlenmaterial ergebenden Konsequenzen soll in der Diskussion näher eingegangen werden.

### 3. Die Selbstungsnachkommenschaften der Ringpflanzen

Als Ergebnis der Brückenbildungen in Anaphase I und II sind in Abhängigkeit von der Häufigkeit und Lokalisation der Austauschvorgänge, je nach dem, an welcher Stelle die Durchtrennung der Brücke erfolgt, Gonen mit vollständigem, stab- bzw. ringförmigem 6. Chromosom und solchen, deren 6. Chromosom Duplikationen oder Defizienzen aufweist, zu erwarten. Diese Tatsache drückt sich zunächst in der stark herabgesetzten Fertilität der Ringpflanzen aus. So betrug die Anzahl der Samen pro Kapsel im Durchschnitt  $31,2 \pm 3,05$ , wovon  $11,25 \pm 1,57$ , d.h. 36%, keimfähig waren. Unter gleichen Bedingungen im Gewächshaus geselbstete Sippe-50-Pflanzen erbrachten  $95,07 \pm 7,58$  Samen pro Kapsel mit einer Keimfähigkeit von 92%.

Tabelle 3. Anteil an Ringpflanzen in Ringpflanzennachkommenschaften

Jahr	Pflanzen-Nr.	Ohne Ring	Mit Ring	Sonstige Genom- und Chromosomenmutanten
1956	H 1	137	42	1 Pflanze mit 2 Ringen
	H 3	26	7	
	H 5	99	7	2 Purpurea, 1 Anaemica, 1 mit $2n + 1$ Fragment, 3 Triploide
	H 6	325	63	
	H 8	6	2	
	H 1 $\times$ H 6	25	1	
	Gesamt	618	122	740 = 16,5%
1957	H 1	11	2	
	H 3	11	4	
	H 6	15	4	
	Gesamt	37	10	47 = 21,3%
Zusammen		655	132	787 = 16,8%

In den 1956 und 1957 aufgezogenen Nachkommenschaften wurden neben 655 normalen 132 Pflanzen mit einem Ringchromosom gefunden (Tabelle 3). Das Fehlen einer größeren Anzahl von Fragmentpflanzen

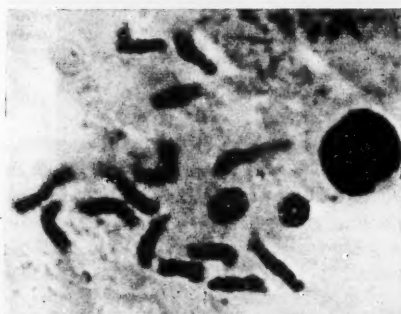


Abb. 12. Metaphase (Mitose) einer Pflanze mit 14 stabförmigen und 2 Ringchromosomen

oder phänotypisch abweichenden Formen stützt die bei der Untersuchung großer Nachkommenschaften auf Genom- und Chromosomenmutationen (MICHAELIS 1959) gemachte Feststellung, daß es bei *A. majus* nur in seltenen Fällen zu einer Übertragung aberranter Chromosomen auf die folgende Generation kommt. Es muß angenommen werden,

daß die Gonen mit Deletionen bzw. Duplikationen nicht oder nur sehr selten zur Befruchtung gelangen.

In einer der Ringpflanzennachkommenschaften wurde eine Pflanze mit 14 stabförmigen und 2 Ringchromosomen gefunden (Abb. 12). Sie war nicht lebensfähig und ging nach Bildung des zweiten Blattpaares ein. Dieser Fall zeigt, daß zwar die mit der Bildung eines Ringchromosoms bei *A. majus* verbundene genotypische Unbalance noch nicht so groß ist, daß ernste Störungen der vegetativen Phase eintreten, daß aber die Homozygotie für den Ring eine Unbalance bewirkt, die zur Letalität führt.

#### IV. Diskussion

Theoretisch sind Brückenbildungen in der Meiose von Ringpflanzen als Ergebnis bestimmter Austauschvorgänge im Ring-Stab-Bivalent zu erwarten. Aus der prozentualen Häufigkeit der einzelnen Typen müssen sich Hinweise auf die Anzahl und Verteilung der Chiasmata im Ring-Stab-Bivalent ergeben. Der Wert dieser Hinweise liegt darin, daß die an Hand des abnormen Paarungsverbandes gewonnenen Ergebnisse eine zytologisch begründete Aussage zur Chiasmafrequenz auch bei Objekten ermöglichen, deren normale Paarungskonfiguration aus verschiedenen Gründen eine derartige Aussage nicht zulassen. Zwangsläufig müssen derartige zytologische Ableitungen zum Problem der Chiasmabildung allerdings immer mehr oder weniger unsicher bleiben und können nur relativ grobe Annäherungswerte an die tatsächlich realisierten Verhältnisse erbringen. Exakte Aussagen müssen umfassenden kombinierten zytologischen und genetischen Analysen vorbehalten bleiben, die allerdings ein entsprechend günstiges Objekt erfordern.

Für eine Interpretierung der tatsächlich gefundenen Werte ist es zunächst notwendig, die theoretisch zu erwartenden, prozentualen Anteile der verschiedenen Anaphasekonfigurationen zu ermitteln. Wichtig ist dabei die Frage nach der Anzahl der Chiasmata, die in dem betreffenden Bivalent angelegt werden. Ob in einem Chromosomenarm überhaupt Austausch stattgefunden hat oder nicht, läßt sich zytologisch im Diakinesestadium der Meiose an der Anzahl der Bivalent-Endbindungen pro Zelle festlegen. Eine gelöste Endbindung würde bedeuten, daß im betreffenden Chromosomenarm kein Austausch stattgefunden hat. Ist bei *A. majus* zwischen allen Chromosomenarmen einer Zelle Austausch erfolgt, müßten 16 Endbindungen auftreten. ERNST (1939) fand in 100 PMZ (= 1600 mögliche Endbindungen) von Sippe 50 37 gelöste Endbindungen, d.h. 2,31%. Auswertungen am Gaterslebener Material der Sippe 50 ergaben in 100 PMZ 48 gelöste Endbindungen (3%). Diese gut übereinstimmenden Zahlen geben einen Hinweis darauf, daß unter normalen Bedingungen bei *Antirrhinum* in der überwiegenden Mehrzahl Austauschvorgänge in beiden Chromosomenarmen eintreten. Für diese Überlegungen spricht auch der morphologische Bau der *Antirrhinum*-Chromosomen insofern, als die mediane Centromeranordnung rein mechanisch die Anlage von Chiasmata in beiden Armen in etwa gleicher Häufigkeit zulassen sollte, sofern keine sekundären Hindernisse eintreten.

Die Häufigkeit der in einem oder beiden Chromosomenarmen eintretenden Austauschvorgänge läßt sich bei *A. majus* nur schwer abschätzen, da das als „Diffusstadium“ auftretende Diplotän, in dem bei geeigneten Objekten die Anzahl der erfolgten Austauschvorgänge direkt ausgezählt werden kann, einer Analyse nicht zugänglich ist und





keine bedeutenden Verschiebungen mehr erfahren und häufigerer Austausch pro Bivalent darüber hinaus an sich nicht sehr wahrscheinlich ist und wohl nur in Extremfällen eintritt, soll die theoretische Erörte-

Prophase	Anaphase I	Telophase II	
g			
h			
i			
k			
l			
m			

und Einfachaustausch im anderen Chromosomenarm, der zur Entstehung von 2 Einfachbrücken in Anaphase II führt. k Einer der Typen mit Doppelaustausch in beiden Chromosomenarmen, der zur Entstehung einer Doppelbrücke in Anaphase II führt. l Mögliche Entstehungsweise einer Doppelbrücke in Anaphase II nach 2-Strang-Doppelaustausch in einem Chromosomenarm mit einem zusätzlichen Schwesterchromatidenaustausch im Ringchromosom. m Mögliche Entstehungsweise von 2 Einfachbrücken in Anaphase II nach Einfachaustausch in beiden Chromosomenarmen mit einem zusätzlichen Schwesterchromatidenaustausch distal im Ringchromosom  
(Bruchenden nach Brückenriß: Wellenlinie)

rung der mit den Austauschvorgängen verbundenen zytologischen Charakteristika auf den Eintritt von maximal 4 Austauschvorgängen im Ring-Stab-Bivalent beschränkt werden.

Der einfachste Fall eines Crossing-over zwischen zwei beliebigen Nichtschwesterchromatiden des Ring-Stab-Bivalentes wird stets in der A I eine Brücke ergeben (Abb. 13a). In der A II sind ein normales stabförmiges, ein Ringchromosom und 2 Chromosomen mit Bruchenden zu erwarten, die, je nachdem an welcher Stelle die Durchtrennung der Brücke in A I erfolgt ist, Deletionen bzw. Duplikationen aufweisen können. Treten mehrere Austauschvorgänge in einem oder in beiden Chromosomenarmen auf, komplizieren sich die Verhältnisse dem Einfachaustausch gegenüber wesentlich. Eine schematische Darstellung der Entstehungsweise unterschiedlicher Anaphasekonfigurationen nach verschiedenen Mehrfach Austauschvorgängen gibt die Abb. 13b—m.

Unter der Voraussetzung, daß keine Chromatideninterferenz auftritt, also alle Chiasmata mit gleicher Wahrscheinlichkeit zwischen allen 4 Chromatiden des Ring-Stab-Bivalentes angelegt werden und keine Strangkombination bevorzugt am Austausch beteiligt ist, ergeben sich die für die einzelnen Austauschvarianten berechneten, in der Tabelle 4a aufgeführten theoretischen Werte. Nach den allgemein gültigen Vorstellungen über die Austauschvorgänge in Bivalenten müßte es möglich sein, eine annähernde Übereinstimmung zwischen den experimentell ermittelten Daten und einer Kombination aus den theoretischen Werten zu finden, wobei jede Austauschvariante mit durchaus unterschiedlicher Häufigkeit beteiligt sein könnte (z.B. mehr Doppelaustausch als Einfachaustausch usw.). Ein Blick auf die Tabelle 4a zeigt aber, daß eine solche Übereinstimmung deshalb nicht gegeben ist, weil 1. nur etwa  $\frac{1}{10}$  der zu erwartenden A I-Doppelbrücken gefunden wurde, 2. die Häufigkeit der A II-Einfachbrücken etwa das  $1\frac{1}{2}$ -fache der berechneten beträgt und 3. der Anteil von A I-PMZ ohne Brücke theoretisch höher sein müßte als tatsächlich gefunden.

Nach den theoretischen Erwartungen müßten A I-Doppelbrücken bei Eintritt von zwei und mehr Crossing-over im Ring-Stab-Bivalent in Abhängigkeit davon, ob der Austausch in einem Arm oder in beiden erfolgte, und in Abhängigkeit von der Berücksichtigung 2- und 3maligen Austausches in einer Minimalfrequenz von 12,5% und einer Maximalfrequenz von 50,0% auftreten. Demgegenüber liegt der tatsächlich realisierte Anteil von A I-Doppelbrücken bei 1,6%. Dabei bleibt zunächst der Prozentsatz unberücksichtigt, den die Ring-Stab-Bivalente ausmachen, welche möglicherweise nur einen Austausch eingegangen sind, zumal diese Fälle auf Grund der Endbindungsanzahlungen kaum ins Gewicht fallen dürften.

Tabelle 4. Die theoretischen Werte der Anaphasekonfigurationen nach verschiedenen Austauschvarianten

Anzahl der Xta		Zusätzlicher Schwesterchromatidenaustausch (SCA)	Anaphase I			Anaphase II			
in einem Arm	im anderen Arm		Einfachbrücke	Doppelbrücke	Ohne Brücke	Einfachbrücke	2 Einfachbrücken	Doppelbrücke	Ohne Brücke
Experimentell ermittelte Werte in Prozent. . . . .			53,5	1,6	44,9	43,0	8,7	1,0	47,3
a) 1	—		100,0	—	—	—	—	—	100,0
2	—		50,0	25,0	25,0	25,0	—	—	75,0
3	—		75,0	12,5	12,5	25,0	—	6,25	68,75
1	1		—	50,0	50,0	25,0	—	—	75,0
1	2		62,5	18,75	18,75	25,0	6,25	—	68,75
2	2		50,0	25,0	25,0	31,25	3,125	3,125	62,5
b) 1	—	+ 1 SCA im Ring	50,0	—	50,0	50,0	—	—	50,0
2	—	+ 1 SCA distal im Ring	25,0	50,0	25,0	25,0	—	25,0	50,0
2	—	+ 1 SCA proximal im Ring	25,0	50,0	25,0	25,0	—	25,0	50,0
2	—	+ 1 SCA zwischen den Nicht-SCA	50,0	25,0	25,0	25,0	—	25,0	50,0
1	1	+ 1 SCA distal im Ring	—	50,0	50,0	25,0	25,0	—	50,0
1	1	+ 1 SCA proximal im Ring	—	50,0	50,0	25,0	25,0	—	50,0
1	2	+ 1 SCA distal im Ring	50,0	25,0	25,0	50,0	6,25	—	43,75
1	2	+ 1 SCA proximal im Ring	56,25	25,0	18,75	43,75	6,25	—	50,0
1	2	+ 1 SCA zwischen den Nicht-SCA	50,0	25,0	25,0	50,0	6,25	—	43,75
2	2	+ 1 SCA distal im Ring	50,0	25,0	25,0	31,25	3,125	9,375	56,25
Theoretisch ermittelte Werte (vgl. Text) . . . . .			55,6	1,6	42,8	42,5	6,9	0,9	50,6

Die Häufigkeit von 1,0% Doppelbrücken in A II könnte dafür sprechen, daß mehr als 2 Austauschvorgänge im Ring-Stab-Bivalent auftreten. Berücksichtigt man dabei nur Doppelaustausch in beiden Armen als einzig realisierte Chiasmaanlage, so wären 3,125% A II-Doppelbrücken zu erwarten. Tatsächlich gefunden wurden 1,0%, d. h. 30% des unter den obengenannten Voraussetzungen theoretisch zu erwartenden Wertes, so daß der Eindruck entstehen könnte, daß 30% aller Austauschvorgänge im Ring-Stab-Bivalent diesem Austauschmodus zuzuordnen wären. Bei Richtigkeit dieser Vorstellungen müßten allerdings in A I etwa 9% Doppelbrücken auftreten, eine Annahme, die mit der tatsächlich gefundenen A I-Doppelbrückenfrequenz (1,6%)

nicht in Einklang zu bringen ist. Die Berücksichtigung des wenig wahrscheinlichen Auftretens von etwa 12,5% Dreifachaustausch in einem Chromosomenarm und fehlender Chiasmabildung im anderen, wobei theoretisch  $\frac{1}{8}$  von 6,25%, d. h. 0,78%, Doppelbrücken in A II und 1,75% ( $\frac{1}{8}$  von 14,05%) in A I vorkommen können, würde an und für sich mit den gefundenen Werten für Doppelbrücken befriedigend übereinstimmen. Allerdings finden damit die 8,7% Zellen mit 2 Einfachbrücken in A II noch keine Erklärung, die sich bei Zugrundelegung von Austauschvorgängen zwischen Nichtschwesterchromatiden nicht einmal dann interpretieren lassen, wenn Doppelaustausch in einem Chromosomenarm und Einfachaustausch im anderen oder Doppelaustausch in beiden Armen angenommen wird. Dabei entstehen theoretisch 6,25% 2 Einfachbrücken in A II bzw. nach Doppelaustausch in beiden Armen 3,125%. Neben diesen in A II zu erwartenden 2 Einfachbrücken müßten im ersten Falle 18,75%, im zweiten Falle 25,0% Doppelbrücken in A I entstehen. Beide Werte liegen weit über den experimentell ermittelten, und es besteht wohl keine Veranlassung zu der Annahme, daß die zur Entstehung der beiden Einfachbrücken führende Austauschsequenz bevorzugt eintritt. Diese Überlegungen geben Veranlassung, nach anderen Möglichkeiten zu suchen, die eine Erklärung der gefundenen Anteile eventuell unter Einführung eines anderen Austauschmodus möglich machen.

Ähnliche, nach den bisher geläufigen Anschauungen ebenfalls schwer erklärbare Daten fand SCHWARTZ (1953) für ein ringförmig geschlossenes, heterozygot vorliegendes Chromosom 6 beim Mais (Tabelle 2 letzte Spalte). Da dieses Chromosom ein subterminal lokalisiertes Centromer besitzt und deshalb nur Austauschvorgänge in einem Chromosomenarm anzunehmen sind, sind die theoretischen Erörterungen einfacher und können auf Einfach-, Doppel- und Dreifachaustausch in dem betreffenden Chromosomenarm beschränkt werden. Im Gegensatz zu *Antirrhinum* fällt an den experimentellen Daten von SCHWARTZ das relativ häufige Vorkommen von Doppelbrücken besonders in A II auf. Das den theoretischen Erwartungen gegenüber ebenfalls verstärkte Auftreten von A II-Einfachbrücken deckt sich mit den bei *A. majus* erhaltenen Ergebnissen. Zwei A II-Einfachbrücken sind theoretisch nicht zu erwarten, wenn sich der Austausch auf einen Chromosomenarm beschränkt. Sie können allerdings beim Mais auch nur ungenau erfaßt werden, da bei diesem Objekt schon nach der A I Zellwände angelegt werden und die Tochterzellpaare durch die Quetschpräparation häufig voneinander getrennt werden.

Bei Berücksichtigung der obengenannten Austauschvorgänge sind im Höchstfall 25% A II-Einfachbrücken zu erwarten (vgl. Tabelle 4a), dazu müßten mindestens 15% Doppelbrücken in A I auftreten (wenn nur Dreifachaustausch erfolgt). Gefunden wurden aber etwa dreimal mehr

A II-Einfach- als A I-Doppelbrücken. Diese Differenz könnte als Folge einer negativen Chromatideninterferenz auftreten, d.h., bei Beteiligung einer bestimmten Chromatide an einem Crossing-over müßte die Wahrscheinlichkeit erhöht werden, daß dieselbe Chromatide auch an einem zweiten Austausch beteiligt wird. Auf diese Weise müßten Anaphasekonfigurationen nach 3-Strang-Doppelaustausch (d.h., ein Strang ist an beiden Crossing-over beteiligt) häufiger gebildet werden als aus 4-Strang-Doppelaustausch stammende, bei denen jeder Strang nur an einem Austausch beteiligt ist. In diesem Fall müßte allerdings noch erwartet werden, daß die Häufigkeit von 2-Strang-Doppelaustausch über der des 3-Strang-Doppelaustausches liegt. Daß dies nicht der Fall ist, zeigen die 28% A I-Zellen ohne Brücken.

Da sich darüber hinaus auch noch andere Indizien auffinden ließen, die gegen das Eintreten einer negativen Chromatideninterferenz sprechen, wird von SCHWARTZ (1953) versucht, die beim Mais erhaltenen experimentellen Daten durch das Eintreten zusätzlichen Schwesterchromatidenaustausches (SCA) zu erklären. Durch die Annahme, daß zusätzlich zu Nichtschwesterchromatidenaustausch eine ungerade Zahl der postulierten Schwesterstrangaustauschvorgänge auftritt, ist es möglich, für die beim Mais erhaltenen experimentellen Daten eine Erklärung zu finden. In ungerader Zahl auftretende Schwesterstrangaustauschvorgänge, verbunden mit einfachem Nichtschwesterstrangaustausch, ergeben nämlich ebenfalls A II-Einfachbrücken, während geradzahlig, zusätzlich zum Nichtschwesterchromatiden-Doppelaustausch auftretender Schwesterchromatidenaustausch keine zytologischen Folgen hat (Abb. 13 l u. m). Bei Einführung eines derartigen hypothetischen Austauschmodus erscheint der im Material von SCHWARTZ auftretende Überschuß an A II-Einfachbrücken gerechtfertigt und verständlich.

In Analogie zu der von SCHWARTZ angewendeten Verfahrensweise wurde der Einfluß zusätzlichen Schwesterchromatidenaustausches auf die Verteilungshäufigkeit der zytologischen Austauschergebnisse untersucht. In der Tabelle 4b sind die für *A. majus* berechneten theoretischen Werte zusammengefaßt, wobei zu den entsprechenden Nichtschwesterchromatiden-Austauschvorgängen (NSCA) jeweils ein in bestimmter Lage zu den anderen (proximal, distal, zwischen den NSCA) angelegter Schwesterchromatidenaustausch berücksichtigt worden ist. Treten mehrere SCA-Vorgänge im Ring in gerader Anzahl auf, bleiben die theoretischen Werte die gleichen wie nach den entsprechenden NSCA. In ungerader Anzahl angelegte SCA im Ring führen zu denselben Anaphasekonfigurationen wie nach einem SCA. SCA im stabförmigen Partnerchromosom ziehen keinen zytologisch faßbaren Effekt nach sich.

Die Werte der Tabelle 4b zeigen einerseits, daß es auch durch Einführung von Schwesterstrangaustausch nicht möglich ist, eine Erklärung für den Ausfall der A I-Doppelbrücken zu finden, die in

Verbindung mit zwei A II-Einfachbrücken mindestens in 25% der PMZ in der Anaphase I auftreten müßten. Sie geben aber andererseits dann die einzig mögliche Erklärung für das gehäufte Auftreten der A II-Einfachbrücken in Verbindung mit zwei A II-Einfachbrücken, A II-Doppelbrücken und dem niedrigeren Prozentsatz von A II-PMZ ohne Brücke, wenn man annimmt, daß zum überwiegenden Teil die Austauschvarianten „Einfachaustausch in einem, Doppelaustausch im anderen Chromosomenarm“ und „Doppelaustausch in beiden Chromosomenarmen“ mit jeweils einem zusätzlichen SCA im Ring in einem Verhältnis von 9:1 auftreten und außerdem der größere Teil der A I-Doppelbrücken als Folge eines vorläufig noch unbekannten Mechanismus nicht realisiert oder vorzeitig eliminiert wird und an seiner Stelle A I-PMZ ohne Brücken entstehen. Unter diesen Voraussetzungen wurden die in der letzten Zeile der Tabelle 4 aufgeführten Werte berechnet. Sie setzen sich zusammen aus 90% „1+2+1 SCA proximal im Ring + 10% „2+2+1 SCA distal im Ring“. Von den sich dabei ergebenden 25% Doppelbrücken in A I wurden 23,4% den 19,4% A I-PMZ ohne Brücken zugeschlagen. Diese Rechnung gilt allerdings nur mit allen Vorbehalten, da die übrigen Austauschvarianten mit unterschiedlichen Anteilen ebenfalls am Gesamtaustauschgeschehen beteiligt sein werden.

Während die von SCHWARTZ beim Mais beschriebenen Verhältnisse ziemlich klar liegen, erscheint die kritiklose Übertragung der Vorstellung von SCHWARTZ zum Austauschmodus auf Ringchromosomen anderer Objekte nicht ohne weiteres gerechtfertigt zu sein. Ein Vergleich der bei *A. majus* experimentell ermittelten Daten mit den theoretisch zu erwartenden macht dieses deutlich. Auch hier liegen zwar Hinweise auf den Eintritt von Schwesterchromatidenaustausch vor, aber selbst bei dessen Berücksichtigung ist es noch nicht ohne weitere Zusatzannahmen möglich, experimentelle und theoretische Daten in Übereinstimmung zu bringen, da die Doppelbrückenfrequenz in A I nicht die erforderliche Höhe erreicht. Warum bei *A. majus* die Doppelbrücken zum größten Teil fehlen, ist ungewiß. Auszuschalten ist die Möglichkeit, daß sie gar nicht gebildet werden, da sich unter dieser Voraussetzung ebenfalls Verschiebungen in anderen Austauschklassen ergeben müßten. Entstehung der Doppelbrücken und ihre Umwandlung in andere Anaphasekonfigurationen durch weitere Austauschvorgänge ist nicht anzunehmen, so daß vermutet werden muß, daß sie entweder auf Grund der zytologischen Ungunst des Objektes nicht in der tatsächlichen Höhe erfaßt werden können oder bei regelmäßiger Bildung vorzeitig der Elimination anheimfallen.

Die Frage, ob überhaupt Austauschvorgänge zwischen Schwesterchromatiden eintreten, ist wiederholt diskutiert worden. Eine Anzahl von Autoren (WEINSTEIN 1936, SHULT und LINDEGREN 1957) stellen einen solchen Vorgang in Frage bzw. lehnen ihn überhaupt ab. Ein-



deutig dafür zu sprechen scheinen die schon beschriebenen Untersuchungen von SCHWARTZ (1953) am Mais und an attached-X-Chromosomen von *Drosophila* (SCHWARTZ 1954) und die stets bei Vorliegen von Ringchromosomen in der Mitose auftretenden dizentrischen Ringe von doppelter Größe. Das Vorkommen von zusätzlichem SCA in praktisch allen PMZ könnte dadurch verständlich werden, daß im Verlauf der gegenüber der mitotischen Prophase bedeutend verlängerten meiotischen Prophase die Chance zu Austauschvorgängen zwischen Schwesterchromatiden stark erhöht ist. Außerdem sprechen für ein häufigeres Vorkommen von SCA im 6. Chromosom von *A. majus* die in der Mitose gefundenen Werte für doppeltgroße Ringe, die fast 3mal so hoch liegen wie die von SCHWARTZ für Mais ermittelten.

Die mit der Deutung der experimentellen Werte verbundene Annahme, daß nur Einfach- in einem und Doppelaustausch im anderen Chromosomenarm bzw. Doppelaustausch in beiden auftritt, würde gut mit den Daten übereinstimmen, die bei den Endbindungsausählungen gewonnen wurden und dafür sprechen, daß mindestens in jedem Chromosomenarm ein Chiasma angelegt wird.

#### Summary

The mitotic and meiotic behaviour of a ring-chromosome in *Antirrhinum majus* was analysed. 26.5% mitotic anaphases showed bridges demonstrating the occurrence of a crossing-over-like process in meristematic cells. From pachytene studies the ring-chromosome could be identified as chromosome 6.

An attempt was made to derive the details of the crossing-over process from the various anaphase configurations in pollen mother cells with a heterozygous ring-rod-bivalent. The observed frequencies could only be brought in approximate correspondence with theoretical values by postulating (i) the occurrence of sister-strand and non-sister-strand crossing-over in certain quantitative combinations, and (ii) an unexplained loss or irrrecognizability of most double bridges in anaphase I.

The frequency of plants heterozygous for the ring-chromosome in progenies after selfing was 16.8%. The rate of chromosome mutations in these progenies was not increased. Chromosomal aberrations resulting from meiotic disturbances in the ring plants are probably lost by gonadal elimination of unbalanced chromosome sets.

#### Literatur

- BATTACHARYA, P.: Behavior of the ring-chromosome in *Drosophila melanogaster*. Proc. roy. Soc. (Lond.) B 64, 199—215 (1950).  
BRAVER, G., and J. L. BLOUNT: Somatic elimination of ring chromosomes in *Drosophila melanogaster*. Genetics 35, 98 (Abstr.) (1950).  
BROWN, S. W., and A. HANNAH: An induced maternal effect on the stability of the ring-X-chromosome of *Drosophila melanogaster*. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 38, 687—693 (1952).

- DARLINGTON, C. D., and L. F. LACOUR: Chromosome breakage and the nucleic acid cycle. *J. Genet.* **46**, 180 (1945).
- , and M. B. UPCOTT: Spontaneous chromosome change. *J. Genet.* **41**, 297—338 (1941).
- ERNST, H.: Meiosis and crossing over. *Zytologische und genetische Untersuchungen an *Antirrhinum majus* L.* *Z. Bot.* **33**, 241—294 (1938). — *Zytogenetische Untersuchungen an *Antirrhinum majus* L.* *Z. Bot.* **34**, 91—111 (1939).
- GILES, N.: Spontaneous chromosome aberrations in *Tradescantia*. *Genetics* **25**, 69—87 (1940).
- LEVAN, A.: Self-perpetuating ring chromosomes in two human tumours. *Hereditas* (Lund) **42**, 366—372 (1950).
- MCCLINTOCK, B.: A correlation of ring-shaped chromosomes with variegation in *Zea mays*. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **18**, 677—681 (1932). — The production of homozygous deficient tissue with mutant characteristics by means of the aberrant mitotic behavior of ring-shaped chromosomes. *Genetics* **23**, 315—376 (1938). — Spontaneous alterations in chromosome size and form in *Zea mays*. *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* **9**, 72—80 (1941).
- MECHELKE, F.: Ein Fall natürlicher Triploidie und vereinzelter Ringchromosomenbildung bei *Hordeum spontaneum* Koch. *Z. induct. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* **83**, 442—446 (1951).
- MICHAELIS, A.: Über den Fall „Angusta“ und die Häufigkeit spontaner Genom- und Chromosomenmutationen bei *Antirrhinum majus* L. *Kulturpflanze* **7** (1959) (im Druck).
- MORGAN, L. V.: A closed X chromosome in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **18**, 250—283 (1933).
- NAWASCHIN, M.: Unbalanced somatic chromosomal variations in *Crepis*. *Univ. Calif. Publ. Agr. Sci.* **6**, 95—106 (1930).
- RIEGER, R.: Inhomologenpaarung und Meioseablauf bei haploiden Formen von *Antirrhinum majus* L. *Chromosoma* (Berl.) **9**, 1—38 (1957).
- SCHULTZ, J., and D. G. CATCHESIDE: The nature of closed X chromosomes in *Drosophila melanogaster*. *J. Genet.* **35**, 315—320 (1937).
- SCHWARTZ, D.: The behavior of an X-ray-induced ring chromosome in maize. *Amer. Naturalist* **87**, 19—28 (1953). — Evidence for sister-strand crossing-over in maize. *Genetics* **38**, 251—260 (1953). — Studies on the mechanism of crossing-over. *Genetics* **39**, 692—700 (1954). — Studies on crossing-over in maize and *Drosophila*. *J. cell. comp. Physiol.* **45**, Suppl. 2, 171—188 (1955).
- SHULT, E. E., and C. C. LINDEGREN: Orthoorientation: a new tool for genetical analysis. *Genetica* **29**, 58—82 (1958).
- STINO, K. R.: Inheritance in *Nicotiana tabacum*. *J. Hered.* **31**, 19—24 (1940).
- STURTEVANT, A. H., and G. W. BEADLE: The relations of inversions in the X-chromosome of *Drosophila melanogaster* to crossing-over and disjunction. *Genetics* **21**, 554—604 (1936).
- UPCOTT, M.: The genetic structure of *Tulipa*. II. Structural hybridity. *J. Genet.* **34**, 339—348 (1937).
- WEINSTEIN, A.: The theory of multiple-strand crossing-over. *Genetics* **35**, 155—199 (1935).

Dr. ARND MICHAELIS, Institut für Kulturpflanzenforschung  
Gatersleben, Kr. Aschersleben

Aus dem Institut für Kulturpflanzenforschung  
der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin in Gatersleben  
und dem Institut für Genetik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ZUR VERTEILUNG  
DURCH VERSCHIEDENE MUTAGENE INDUZIERTER BRÜCHE  
ÜBER DEN CHROMOSOMENSATZ VON VICIA FABA L.

Von

R. RIEGER und A. MICHAELIS

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 27. Dezember 1958)

I. Einleitung

Die Bedeutung von Untersuchungen zur Verteilung induzierter und spontaner Chromosomenaberrationen über das Einzelchromosom und den Chromosomensatz liegt darin, daß sich Hinweise auf eine strukturelle Verschiedenheit von Chromosomenregionen dann andeuten könnten, wenn die Bruchpunktverteilung nicht zufallsgemäß ist und bestimmte Abschnitte häufiger am Bruchgeschehen beteiligt werden als andere. Der Nachteil aller dieser Untersuchungen liegt darin, daß es in keinem Fall möglich ist, die Verteilung der Brüche im Zeitraum ihrer Entstehung im Interphasekern zu verfolgen, sondern in jedem Falle zwischen Bruchauslösung und Brucherfassung ein mehr oder weniger großer Zeitraum verstrichen ist, in dem eine Fülle sekundärer Reaktionen eintreten kann.

Diese Tatsache läßt es zu, daß von vornherein zwei verschiedene Standpunkte eingenommen werden können. Es kann 1. von dem Postulat ausgegangen werden, daß sich ursprünglich alle durch ionisierende Strahlen induzierten Brüche zufallsgemäß verteilen, wie es von der Treffertheorie in ihrer einfachsten Form gefordert wird, oder es wird 2. angenommen, daß bereits bei der Induktion der Brüche nichtzufallsgemäße Verteilungen eintreten können. Die meisten Analysen gehen von der ersten Annahme aus (NEWCOMBE 1942; CATCHESIDE, LEA und THODAY 1946) und erklären jede Abweichung durch nichtzufallsgemäße Restitution, Reunion, unterschiedliche Spiralisation oder (im Falle *Drosophila*) durch Schwierigkeiten bei der Messung der Chromosomenlänge auf Grund von Heterochromatin. Neuerdings dürfte die 2. Möglichkeit eine starke Stütze dadurch erhalten, daß nachgewiesenermaßen ein nicht unerheblicher Teil der Wirkung ionisierender Strahlen indirekt über Stoffwechselveränderungen erfolgt (JACKSON und BARBER 1958).

Die bisher nach Einwirkung ionisierender Strahlen vorliegenden Angaben zur Verteilung der Aberrationen sind sehr uneinheitlich. Selbst am gleichen Objekt sind verschiedene Autoren zu unterschiedlichen

Ergebnissen gekommen. Viel einheitlichere Ergebnisse liegen demgegenüber im Falle der Bruchauslösung durch chemische Mutagene vor.

Die aufgezeigten Schwierigkeiten, die in der Unmöglichkeit begründet liegen, die ursprüngliche Bruchpunktverteilung mit der Erwartung bei zufallsgemäßigem Brucheintritt zu vergleichen, lassen es angezeigt erscheinen, nicht nur die Aberrationsverteilung in der Metaphase nach dem Brucheintritt mit der Erwartung zu vergleichen, sondern darüber hinaus die Wirkungen verschiedener Mutagene bezüglich der Verteilung der durch sie induzierten Aberrationen einander gegenüberzustellen. Wenn sich auch hiermit keine direkte Aussage zur ursprünglichen Bruchverteilung machen läßt, so dürfte der Vergleich indirekt doch einige Schlüsse in dieser Richtung ermöglichen, da erwartet werden darf, daß eine ganze Reihe möglicher, dem Brucheintritt folgender Sekundäreignisse übereinstimmt. Aus diesem Grunde haben wir die Aberrationsverteilung nach der Einwirkung von Röntgenstrahlen und automutagenen Substanzen auf Interphasekerne in der Metaphase der Wurzelspitzenmitose von *Vicia faba* L. zu erfassen versucht. Über die Entstehung der Automutagene und erste Versuche, die Aberrationen nach ihrer Verteilung zu erfassen, wurde bereits berichtet (RIEGER und MICHAELIS 1958, MICHAELIS und RIEGER 1958).

## II. Material und Methodik

Angaben über die Bruchauslösung durch Automutagene, Präparationsmethodik und Festlegung der Bruch- und Reunionspunkte sind bereits in den oben zitierten Veröffentlichungen gemacht worden. Für die Röntgenversuche wurden Samen mit 2–3 cm langen Keimwurzeln in 4 Gruppen mit 100, 150, 200 und 250 r bestrahlt und nach 17 bzw. 24 Std in Alkohol-Eisessig fixiert. Zur Bestrahlung diente eine Röntgen-Tiefen-Therapieanlage (160 kV, 8 mA, 0,5 cm Cu-Filter, 36,6 cm Abstand vom Objekt, mittlere Strahlendosisleistung 21 r/min. ED). Aus den Feulgen-Quetsch-Präparaten dieser 4 Gruppen wurden mit der Zeiss-Miflex von 360 übersichtlichen Metaphaseplatten Mikrophotogramme (4000mal) hergestellt. Eine Auslese dieser Metaphaseplatten erfolgte nur nach ihrer Qualität, so daß angenommen werden kann, daß es sich bei den 360 Aufnahmen (100 mit 181 Brüchen nach 100 r, 60 mit 93 Brüchen nach 150 r, 120 mit 231 Brüchen nach 200 r und 90 mit 217 Brüchen nach 250 r) um eine Stichprobe im statistischen Sinne handelt. Die Messungen erfolgten mit dem Millimetermaßstab, und die absoluten Werte wurden in Relativwerte (Chromosomenarm des SAT-Chromosoms bzw. langer Arm der m-Chromosomen = 100) umgerechnet. Zur übersichtlichen Darstellung wurden die Chromosomenarme in 20 Segmente (0–5,0; 5,1–10,0; 10,1–15,0 usw.) eingeteilt und die Brüche nach ihrem relativen Abstand vom Centromer dem entsprechenden Segment zugeordnet. Zur statistischen Verrechnung dienten die  $\chi^2$ -Tabeln nach PÄTAU (1942).

## III. Ergebnisse

Der diploide Chromosomensatz von *Vicia faba* läßt sich, wie von MICHAELIS und RIEGER (1958) eingehend beschrieben worden ist, mit großer Sicherheit in 4 Chromosomengruppen zerlegen, die im folgenden als die Gruppen I (2 lange SAT-Chromosomen), II–III (4 m-Chromosomen, zweigeteilter und größter kurzer Arm),

IV—V (4 m-Chromosomen, nichtzweigeteilter, in der Größe reduzierter kurzer Arm) und VI (2 m-Chromosomen mit dem kleinsten kurzen Arm) bezeichnet werden. Es ist damit ohne Schwierigkeiten möglich, die Verteilung der induzierten Aberrationen für alle 4 Gruppen getrennt zu erfassen und einmal die Einzelgruppen untereinander zu vergleichen, zum anderen die SAT-Chromosomen mit ihrer doppelten Länge den m-Chromosomen gegenüberzustellen.

### *1. Die Verteilung der Aberrationen über die einzelnen Chromosomengruppen*

In die Auswertung einbezogen wurden die Isolocusbrüche, d. h. Bruchereignisse beider Chromatiden an augenscheinlich identischen Loci (wobei unberücksichtigt blieb, ob die Brüche vor [Chromosomenbrüche] oder nach [Isochromatidenbrüche] der identischen Reproduktion der Stränge eingetreten waren), die freien Chromatidenbrüche, die nicht an irgendwelchen Reunionen beteiligt waren, und die reziproken Chromatidentranslokationen, für die jeweils zwei Chromatidenbrüche in Rechnung gestellt wurden. Wir folgen damit den klassischen Vorstellungen, wonach Bruch und Reunionen getrennte Ereignisse darstellen, und lassen neuere Vorstellungen zur Entstehung von Chromatidenbrüchen und chromatidalen Reunionsprodukten in diesem Zusammenhang unberücksichtigt, da sich hieraus für unsere Ergebnisse keine besonderen Konsequenzen ergeben. Als letzte Kategorie von Aberrationen wurden die sog. „potentiellen Brüche“ erfaßt, die sich in Form von lokalen Achromasien manifestieren (vgl. RIEGER und MICHAELIS 1958). Nicht in die Auswertung einbezogen wurden die Deletionen und Duplikations-Deletionen sowie die Triradialen, da in diesen Fällen eine eindeutige Lokalisierung der Bruchstellen nicht möglich war. Insgesamt lokalisiert wurden 722 Röntgenbrüche und 758 durch Automutagenen induzierte Brüche.

Alle Chromosomen wurden möglichst weitgehend, d. h. in 20 gleich große Segmente, aufgegliedert, um Unterschiede auch in relativ kleinen Bereichen noch erfassen zu können. Die Aberrationen in beiden Schenkeln der SAT-Chromosomen wurden getrennt erfaßt. Jeder dieser beiden Schenkel entspricht etwa der Länge eines der kleinen m-Chromosomen. Diese Unterteilung der Chromosomen in möglichst viele Segmente ist insofern von großer Bedeutung, als die Erfassung der Aberrationen größerer Segmente durchaus dort gesicherte Unterschiede liefern kann und deren Bedeutung erhöht, wo die Verwendung kleiner Segmente als Bezugsgröße keine signifikanten Differenzen zur Zufallsverteilung ergibt.

In Abb. 1 ist die prozentuale Beteiligung der Segmente der Chromosomengruppen (Gruppe I in 2 Hälften untereinander) an der gesamten erfaßten Aberrationsfrequenz nach Einwirkung des Automutagens und der Röntgenstrahlen in Säulen angegeben worden. Die schwarzen Säulen beziehen sich auf die Aberrationen, die durch das automutagene, im

Vicia-Stoffwechsel bei Anaerobiose entstehende Agens ausgelöst worden sind, die gestrichelten Säulen auf röntgeninduzierte Aberrationen. Die Beteiligung der Einzelsegmente wurde für beide Mutagene mit der Erwartung bei zufälligmäßiger Beteiligung der Segmente verglichen.

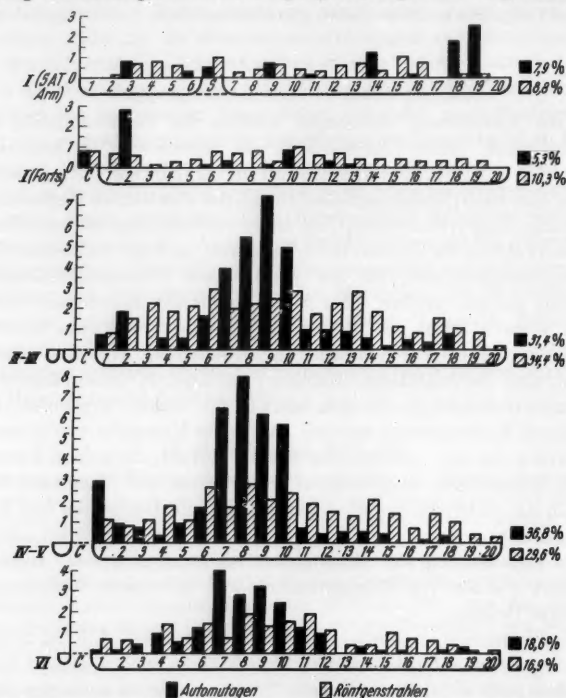


Abb. 1. Prozentuale Beteiligung der Segmente der Chromosomengruppen (Gruppe I in 2 Hälften untereinander) an der gesamten erfaßten Aberrationsfrequenz nach Einwirkung des Automutagens (schwarze Säulen) und der Röntgenstrahlen (schraffierte Säulen). Die Prozentangaben rechts beziehen sich auf die Beteiligung der Chromosomengruppen am Gesamtbruchgeschehen

Für die durch die automutagene Substanz induzierten Aberrationen ist die präferentielle Beteiligung bestimmter Segmente von vornherein offenbar. Es handelt sich im Falle des SAT-Chromosoms besonders um die wahrscheinlich heterochromatischen Segmente 18 und 19 im SAT-Arm und das ebenfalls als heterochromatisch anzusehende Segment 2. Für die 3 Gruppen der m-Chromosomen ist die vorzugsweise Beteiligung der Mittelsegmente 7—10 am Gesamtabbrationsprozentsatz offensichtlich. Auch dieser Chromosomenbereich soll heterochromatisch sein.

Im Gegensatz zu den durch die automutagene, chemisch noch nicht identifizierte Substanz ausgelösten Aberrationen, verteilen sich die durch Röntgenstrahlen induzierten Aberrationen sehr viel gleichmäßiger ohne besonders deutliche, den Bereich der zufälligen Fluktuation überschreitende Maxima. Eine klar zufallsgemäße Verteilung der Brüche über die Chromosomengruppen ließ sich aber auch hier, abgesehen von den beiden Armen der SAT-Chromosomen, nicht nachweisen. Während sich die Brüche im SAT-Chromosom zufallsgemäß über die gesamte Länge verteilen, fällt bei den 3 Gruppen der m-Chromosomen das Aberrationsdefizit am Ende der Chromosomen auf. Für die Chromosomengruppen IV—V und VI tritt zudem noch ein statistisch gesichertes Maximum für Segment 8 auf.

Die Ergebnisse der statistischen Auswertung der Daten ( $\chi^2$ -Test) sind in der Tabelle für die einzelnen Segmente zusammengefaßt dargestellt worden. Die Reihe A bezieht sich auf den Vergleich der Aberrationsbeteiligung des Einzelsegmentes nach Einwirkung des automutagenen Agens mit der Erwartung bei zufallsgemäßer Segmentbeteiligung, Reihe X gibt die Ergebnisse des entsprechenden Vergleiches für die Röntgeneinwirkung an (es bedeuten: 0 = keine gesicherte Abweichung gegenüber der Zufallsverteilung [ $P > 0,01$ ], — = Defizit gegenüber der Erwartung [ $P < 0,01$ ], + = Überschuß gegenüber der Erwartung [ $P < 0,01$ ]). In der letzten Reihe (XA) sind die Ergebnisse des statistischen Vergleiches der Segmentbeteiligung am Bruchgeschehen nach Einwirkung beider Mutagene aufgeführt (es bedeuten: 0 = die Segmentbeteiligung am Bruchgeschehen ist nach Einwirkung beider Agenzien gleich stark [ $P > 0,01$ ], — bzw. + = weniger bzw. mehr durch Automutagene ausgelöste Brüche im betreffenden Segment als Röntgenbrüche). Die P-Werte für die Verteilung der Gesamtbrüche der beiden SAT-Arme und der 3 Gruppen der m-Chromosomen sind jeweils am Ende der A- und X-Reihe aufgeführt.

Das für die Automutagene charakteristische Maximum der Bruchfrequenz rechts und links vom Centromer der SAT-Chromosomen und in der Mitte der langen Schenkel der m-Chromosomen ist sowohl bei Prüfung gegen die Zufallsverteilung als auch im Falle des Vergleiches der Wirkung beider Mutagene klar gesichert. Eine Sicherung im Ausmaß der Endsegmentbeteiligung der m-Chromosomen am Bruchgeschehen nach Einwirkung beider Agenzien ist nicht möglich. Die Bruchfrequenz pro Segment sinkt aber übereinstimmend in beiden Fällen gegen die Chromosomenenden deutlich ab, wobei im Vergleich mit der Erwartung bei Zufallsverteilung (Reihen A und X) der Abfall nach Einwirkung des Automutagens relativ sehr viel schneller erfolgt.

Im Falle der Röntgenbrüche könnte sich als Einwand erheben, daß es relativ schwierig ist, Brüche zu erfassen, die sehr dicht an den



Tabelle. Ergebnisse der statistischen Auswertung der Bruchfrequenz nach Einwirkung von Automaten und Röntgenstrahlen

	C	1	2	3	4	5	6	8	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	P-Wert pro Gruppe
I SAT-Arm		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	+	0	0	$10^{-10}$ 0,015
I Fort- setzung		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$10^{-10}$ 0,48
II-III		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$10^{-10}$ 0,0005
IV-V		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$10^{-10}$ 0,00025
VI		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$10^{-10}$ $10^{-4}$
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

C = Centromer, S = Sekundäreinschnürung, nähere Erklärungen im Text.

Chromosomenenden eingetreten sind, da die Fragmente einmal sehr klein sind und zum anderen nicht eindeutig zu bestimmen ist, zu welchem Chromosom das Fragment gehört, wenn keine Schwesterreunion der Bruchflächen erfolgt ist, da es innerhalb eines Kernes doch recht erhebliche, durch Spiralisationsunterschiede bedingte Längendifferenzen der Chromosomen geben kann. Der Abfall der Röntgenbruchfrequenz,

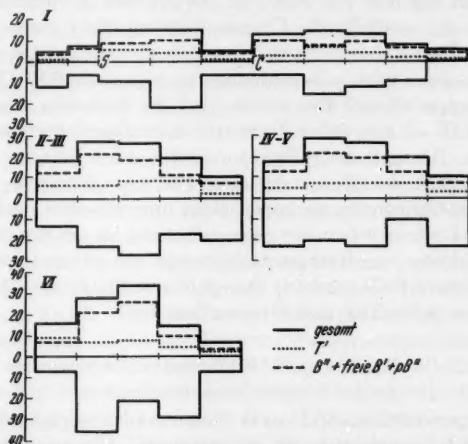


Abb. 2. Oberhalb der Nulllinie prozentuale Segmentbeteiligung (5 Segmente) an der Gesamtfrequenz von Isolocusbrüchen ( $B''$ ), freien Chromatidenbrüchen ( $B'$ ), potentiellen Brüchen ( $pB''$ ) und an Translokationen beteiligten Chromatidenbrüchen ( $T'$ ) pro Chromosomengruppe nach Röntgenbestrahlung. Unterhalb der Nulllinie die in gleicher Weise berechneten Werte (104 Brüche) von FORD (1948)

der sich statistisch gesichert nur auf das letzte bzw. die beiden letzten Segmente der m-Chromosomen bezieht, könnte somit nur vorgetäuscht sein. Um diesen Einwand nach Möglichkeit zu entkräften, ist in Abb. 2 die Verteilung der an Translokationen beteiligten Chromatidenbrüche über die Gruppen durch eine gepunktete Linie angegeben worden, da sich die oben angedeutete Schwierigkeit in der Erfassung der Brüche in den Endsegmenten für die Translokationen nicht ergibt. Es zeigt sich dabei, daß sich für die an Chromatidentranslokationen beteiligten Röntgenbrüche eine gleiche Verteilung wie für die erfaßte Gesamtbruchzahl ergibt und ein Abfall in der Röntgenbruchfrequenz an den Enden der Chromosomengruppen nicht nur vorgetäuscht ist.

Eine ähnliche Analyse wie die von uns für die Bruchverteilung nach Röntgenbestrahlung vorgenommene wurde von FORD (1948) (s. auch GRAY 1951) bei *Vicia faba* für die Bruchverteilung nach  $\gamma$ -Bestrahlung durchgeführt. Auch FORD teilt die m-Chromosomen nach der Länge

der kleinen Arme in 3 Gruppen ein, verwendet aber eine andere Segmentgröße. Um einen Vergleich mit seinen Daten zu ermöglichen, haben wir in Abb. 2 nur 5 Segmente pro SAT-Arm und m-Chromosomengruppe hinsichtlich der Bruchfrequenz unterschieden. Die Bruchfrequenz wurde pro Segment in Prozent von der Gesamtbruchzahl pro Chromosomengruppe angegeben und FORDs Werte entsprechend umgerechnet. Im Vergleich mit den von FORD an 104 Brüchen gewonnenen Ergebnissen fällt die weitgehende Übereinstimmung auf. Auch in FORDs Ergebnissen deutet sich der Abfall der Bruchfrequenz gegen die Enden der Chromosomen nach  $\gamma$ -Bestrahlung zumindest am SAT-Chromosom und an Gruppe VI an. Das unterschiedliche Verhalten der Gruppen II—III und IV—V mag durch die relativ kleine Zahl der erfaßten Brüche bedingt sein. Röntgen- und  $\gamma$ -Strahlen dürften sich demnach erwartungsgemäß bezüglich der Bruchverteilung über die Segmente der SAT-Arme und m-Chromosomengruppen nicht unterscheiden, während sich signifikante Unterschiede in der Segmentbeteiligung am Bruchgeschehen nach Einwirkung von Röntgenstrahlen und der automutagenen Substanz in unserem Falle ergeben. Das gleiche stellte FORD (1948) für die Wirkung von  $\gamma$ -Strahlen und Stickstofflost fest.

## 2. Die Beteiligung der SAT- und m-Chromosomen an den röntgeninduzierten Brüchen

Das Längenverhältnis SAT- zu m-Chromosomen beträgt bei *Vicia faba* etwa 2:5, d. h., bei ungefähr übereinstimmender Länge aller m-Chromosomen weist das SAT-Chromosom die doppelte Länge auf. Verteilen sich die Brüche den Längenverhältnissen folgend über das Genom, wäre entsprechend ein Bruchverhältnis SAT:m wie 2:5 zu erwarten. Bezüglich unserer 722 in der Verteilung über die Chromosomengruppen erfaßten Brüche war es unmöglich, mit dieser Erwartung übereinstimmende Relationen SAT:m zu erlangen. Das Bruchverhältnis lag in unserem Falle bei 1,2:5,0, d. h., das SAT-Chromosom war bei Zugrundelegung seiner doppelten Länge nur etwas mehr als halb so häufig am Bruchgeschehen beteiligt wie die m-Chromosomen.

Dieses für uns unerwartete Ergebnis, das in gleicher Weise für die an Translokationen beteiligten Chromatidenbrüche (1,0:5,0) gilt, gab Veranlassung zu einer nochmaligen Überprüfung. Zu diesem Zweck wurden noch einmal 1035 Brüche erfaßt, von denen 475 nach Bestrahlungen mit 50 r und 560 nach Bestrahlungen mit 100 r entstanden. In Übereinstimmung mit unserer ersten Relation wurde für die Gesamtbruchzahl ein SAT: m-Verhältnis von 1,44:5,0 ermittelt (50 r = 1,33:5,0; 100 r = 1,54:5,0). Im Gegensatz zu unserer ersten Auswertung wurden bei der Überprüfung die Duplikations-Deletionen, Deletionen und Tri- radiale miterfaßt. Es scheint uns damit keinerlei Veranlassung zu

bestehen, unseren ersten Ermittlungen den Charakter einer echten Stichprobe versagen zu müssen. Diesem theoretisch für uns völlig unerwarteten Befund stehen Angaben für das gleiche Objekt von DEUFEL (1951; Röntgendosis 150 r) und REVELL (1953; Röntgendosen 50 und 100 r) gegenüber. Das Bruchverhältnis SAT:m wird dabei von DEUFEL mit 2,1:5,0 und von REVELL mit 2,7:5,0 bzw. 2,07:5,0 angegeben.

Von insgesamt 116 in 6 Segmenten des SAT-Chromosoms lokalisierten Brüchen entfielen nach DEUFEL 16,37% auf die Primär- und 46,5% auf die Sekundäreinschnürung, womit sich eine völlig von der Erwartung bei zufallsgemäßigem Brucheintritt abweichende Bruchbeteiligung der Segmente des SAT-Chromosoms mit starken Maxima in den Einschnürungen ergibt. In unseren Auswertungen entfielen von insgesamt 137 in 40 Segmenten des SAT-Chromosoms lokalisierten Brüchen 4,38% auf die Primär- und 5,10% auf die Sekundäreinschnürung, wobei sich keinerlei Unterschiede zur Zufallsverteilung (s. Tabelle) ergaben. Die Prozent-Differenz für die Ergebnisse von DEUFEL und unsere eigenen beträgt für die Primäreinschnürung 11,99% und für die Sekundäreinschnürung 41,4%. Legt man unsere Bruchpunktlokalisation als richtig zu Grunde und macht von DEUFELs Werten entsprechende Abzüge, so ergibt sich ein Bruchverhältnis SAT:m wie 1,13:5, d. h. praktisch das gleiche Ergebnis, das auch wir erhalten. Die Unterschiede resultieren also nur aus der Zahl der erfaßten Einschnürungsbrüche.

Um möglichst alle Unsicherheiten auszuschließen, haben wir noch einmal 150 Brüche im SAT-Chromosom erfaßt. Von diesen entfielen 6,7% auf die Primär- und 6,0% auf die Sekundäreinschnürung, der Rest verteilte sich ohne Maxima über das Chromosom. Als Bruch in der Sekundäreinschnürung wurden im letzten Fall alle Ereignisse gewertet, die den Abstand Satellit—Restchromosom auf mindestens die 3fache Länge des Satelliten vergrößerten. Wir möchten aus unserem Material, bei dem jede einzelne Zelle photographiert vorliegt, schließen, daß unsere Werte den tatsächlichen Verhältnissen näher kommen und keine Maxima des Brucheintrittes in den Einschnürungen der SAT-Chromosomen von *Vicia faba* eintreten. Das würde bedeuten, daß die SAT- und m-Chromosomen nicht ihrer jeweiligen Länge entsprechend am Bruchgeschehen beteiligt werden. Die gleiche Feststellung ergab sich für die durch Automutagene induzierten Brüche (RIEGER und MICHAELIS 1958). Statt einer längenproportionalen Bruchbeteiligung des SAT-Chromosoms war dieses in beiden Fällen nur etwa halb so oft am Bruchgeschehen beteiligt, als nach seiner Länge zu erwarten ist.

Die Diskrepanz unserer und REVELLs Werte ist uns vorläufig noch völlig unerklärlich, könnte aber bei relativ großer Schwankung zwischen den Präparaten auf die zu kleine, erfaßte Bruchzahl zurückzuführen

sein. Hinzu kommt, daß bei der Erfassung der Brüche in den Einschnürungen der SAT-Chromosomen zweifellos subjektive Momente hinzukommen, da zumindest die Sekundäreinschnürung stark gedehnt und möglicherweise auch im Verlauf der Präparation, besonders nach Färbung mit Karmin-Essigsäure, artifiziel gebrochen werden kann.

Der Unterschied in der Bruchbeteiligung ist nur für den Vergleich der SAT- und m-Chromosomen gültig. Sowohl nach Einwirkung automutagener Agenzien als auch nach Röntgenbestrahlung waren die 3 Gruppen der m-Chromosomen bei Berücksichtigung der Tatsache, daß die Gruppen II—III und IV—V aus je 4 Chromosomen bestehen, etwa gleichmäßig an der Gesamtbruchzahl beteiligt. Der Vergleich der Bruchfrequenz in den Gruppen  $\frac{\text{II—III}}{2}$ :VI und  $\frac{\text{IV—V}}{2}$ :VI brachte mit 1:0,98 und 1:1,14 praktisch übereinstimmende Werte. Das Bruchverhältnis SAT:  $\frac{\text{II—III}}{2}$ , SAT:  $\frac{\text{IV—V}}{2}$  und SAT:VI lag bei 1:0,91, 1:0,78 und 1:0,89. Daraus dürfte klar hervorgehen, daß außer einer Übereinstimmung der

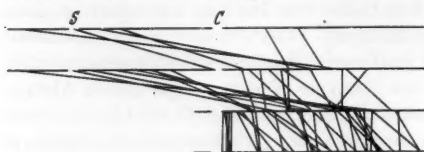


Abb. 3. Die Verteilung von 6 SAT-SAT-, 20 SAT-m- und 34 m-m-Translokationen nach Röntgenbestrahlung

Bruchbeteiligung der 3 m-Chromosomengruppen untereinander eine gleiche Übereinstimmung bei Vergleich der m-Chromosomengruppen mit dem SAT-Chromosom vorliegt.

Außer der Diskrepanz dieser Befunde mit den von DEUFEL (1951) angegebenen Verhältnissen ergeben sich Unstimmigkeiten zu Angaben von FORD (1948) für 403 durch  $\gamma$ -Strahlen bei *Vicia faba* induzierte Brüche. FORD gibt dabei ein SAT:m-Verhältnis von 1,7:5,0 an, findet aber (GRAY 1951) im Gegensatz zu DEUFEL und in Übereinstimmung mit uns keine Bruchmaxima in den Einschnürungen. An sich sollte man nach Einwirkung von Röntgen- und  $\gamma$ -Strahlen keine grundsätzlichen Unterschiede erwarten, so daß uns diese Diskrepanz vorläufig noch unerklärlich ist und überprüft werden muß.

Abschließend mag noch auf einen in Abb. 3 veranschaulichten Unterschied zwischen der Verteilung durch Automutagene (MICHAELIS und RIEGER 1958) und Röntgenstrahlen induzierter Chromatidentranslokationen hingewiesen werden. Für die Automutagene hatte sich ergeben, daß die meisten Translokationsbrüche an homologen Orten und dabei bevorzugt in den Mittelsegmenten der langen Arme der m-Chromosomen lokalisiert waren. Während die Beteiligung bevorzugt homologer Orte an den zu Translokationen führenden Reunionen mit Einschränkung (Ausnahme besonders SAT-SAT- und SAT-m-Translokationen) auch für die röntgeninduzierten Translokationen noch gilt, ist die charakteri-

stische Häufung in den Mittelsegmenten für die an Translokationen beteiligten Röntgenbrüche nicht gegeben. Stattdessen verteilen sich die Translokationen ziemlich gleichmäßig über die gesamte Chromosomenlänge. Gleiche Beobachtungen nach Einwirkung von Diepoxyden und Röntgenstrahlen machte REVELL (1953) für die SAT-SAT-Translokationen.

#### IV. Diskussion

Es wurde bereits in der Einleitung darauf hingewiesen, daß bezüglich der Verteilung röntgeninduzierter Brüche über die Chromosomen stark unterschiedliche Ergebnisse vorliegen, während die Befunde zur Verteilung durch chemische Mutagene induzierter Brüche sehr viel einheitlicher sind. Im letzten Falle sind es besonders die heterochromatischen Abschnitte, die bevorzugt an den Aberrationen beteiligt sind, ohne daß aber die Aberrationen auf diese beschränkt werden (vgl. REVELL 1953, McLEISH 1953, MICHAELIS und RIEGER 1958).

Bezüglich der Verteilung von Röntgenbrüchen liegen sowohl Angaben über rein zufallsgemäße als auch präferentielle Bruchpunktverteilung vor. Eine Reihe von Autoren gibt für das Heterochromatin, andere für das Euchromatin höhere Bruchempfindlichkeit an. Im Extrem wird das DNS-beladene Heterochromatin als völlig bruchresistent bezeichnet (DARLINGTON und LA COUR 1945 bei *Trillium*, DARLINGTON und McLEISH 1951). Nicht nur bei verschiedenen Objekten, sondern auch am gleichen Objekt wurden völlig unterschiedliche Befunde zur Aberrationsverteilung gemacht. Es ist unmöglich, an dieser Stelle näher auf die einzelnen Arbeiten einzugehen. Übersichten finden sich bei GOTTSCHALK (1951), KAUFMANN (1954), GILES (1954) und SWANSON (1957).

In fast allen Fällen ergibt sich als Einwand, daß nicht die ursprüngliche, sondern stets eine möglicherweise durch sekundäre Faktoren (differentielle Restitution, Reunion, differentielle Spiralisierung usw.) veränderte Bruchverteilung erfaßt wird. Die Möglichkeit dieses Einwandes in Verbindung mit treffertheoretischen Anschauungen führt in vielen Fällen dazu, eine zufallsgemäße Ursprungsverteilung der induzierten Brüche auch dort für wahrscheinlich zu halten, wo zum Untersuchungszeitpunkt deutliche Abweichungen auftreten. Das mag zweifellos in einer Reihe von Fällen berechtigt sein (z. B. bei *Tradescantia* nach SAX 1940; SAX und MATHER 1939; SWANSON 1942), darf aber wohl nicht ohne weiteres verallgemeinert werden, wenn bedacht wird, daß ein Teil der Strahlenwirkungen indirekt erfolgt.

Es erscheint uns, als wären am ehesten Schlüsse auf die ursprüngliche Bruchpunktverteilung zu ziehen, wenn unter möglichst gleichwertigen Bedingungen die Verteilungen durch verschiedene Mutagene induzierter Brüche verglichen werden. Wir haben das in der vorliegenden Arbeit versucht und sind der Ansicht, daß die unterschiedliche Segmentbetei-

gung am Bruchgeschehen wohl nicht allein durch sekundäre Einflüsse vorgetäuscht werden kann. Es ist unwahrscheinlich, daß sich nach Einwirkung physikalischer und chemischer Agenzien jene möglicherweise die ursprüngliche Bruchverteilung beeinflussenden Faktoren so grundsätzlich verschieden verhalten, wie sich in unserem Falle anzeigen würde. Diese Ansicht dürfte noch dadurch gestützt werden, daß sich fast alle gründlich auf die Verteilung der durch sie induzierten Brüche untersuchten chemischen Agenzien einheitlich verhalten. In unserem Falle sollten sich in der erfaßten Aberrationsverteilung höchstwahrscheinlich echte Unterschiede in der ursprünglichen Bruchverteilung nach Einwirkung der von uns getesteten Mutagene anzeigen.

Was den Vergleich der Verteilung der Röntgenbrüche mit der Zufallsverteilung angeht, so ergeben sich nach unseren Untersuchungen für die SAT-Chromosomen von *Vicia faba* keine Unterschiede, während sich für 2 Gruppen der m-Chromosomen ein gesichertes kleines Mittelmaximum im langen Arm und für alle 3 Defizite gegenüber der Erwartung für 1—2 Endsegmente anzeigten. Diese Abweichungen gegenüber der Zufallsverteilung sind zwar signifikant, aber verglichen mit den Abweichungen nach Einwirkung des automutagenen Agens relativ unbedeutend. Die Röntgenbrüche verteilen sich damit in Übereinstimmung mit Daten von FORD (1948) nach  $\gamma$ -Bestrahlung ziemlich gleichmäßig über die Chromosomengruppen, ohne aber völlig zufallsgemäß verteilt aufzutreten. Hier könnten sekundäre Faktoren Einfluß genommen haben, und das Defizit am Ende der 3 m-Chromosomengruppen könnte auf deren Wirkung zurückzuführen sein.

Wenn die zuletzt für die Verteilung der Röntgenbrüche besprochenen Abweichungen von der Zufallsverteilung auch nicht allzu ernst genommen werden brauchen, so ergeben sich doch Komplikationen beim Vergleich der Bruchverteilung zwischen den SAT- und den halb so langen m-Chromosomen. Entgegen unseren Erwartungen und entsprechenden Befunden von DEUFEL und von REVELL für Röntgen- und von FORD für  $\gamma$ -Strahlen ergab sich kein 2:5-, sondern ein 1,2:5,0- bzw. 1,44:5,0-Verhältnis auf die SAT- und m-Chromosomen entfallender Brüche. Die abweichenden Angaben von DEUFEL resultierten aus einer überhöhten Bruchfrequenz in den Einschnürungen des SAT-Chromosoms, die von uns nicht bestätigt werden konnte. Die Bruchverteilung SAT:m nach  $\gamma$ -Bestrahlung, die ein 1,7:5,0-Verhältnis brachte, wollen wir versuchen zu reproduzieren.

Nach dem gegenwärtigen Stand der Dinge sind wir geneigt, eine unterschiedliche Bruchsensibilität der SAT- und m-Chromosomen anzunehmen. Auf treffertheoretischer Grundlage ist diese kaum zu erklären, wohl aber dann, wenn zumindest ein Teil der Bestrahlungswirkung indirekt erfolgt. Dieser indirekte Anteil der Röntgenwirkung bei der Bruch-



auslösung dürfte dann auch für die Abweichungen der Bruchverteilung von der Zufallsverteilung im Falle der m-Chromosomen verantwortlich sein und würde eine Parallele bei der Auslösung von Chromosomenaberrationen durch chemische Mutagene finden. Dabei werden im übrigen die SAT- und m-Chromosomen wohl immer unterschiedlich am Bruchgeschehen beteiligt (vgl. RIEGER und MICHAELIS 1958).

Wir sind uns im Falle der Röntgenstrahlen darüber im klaren, daß für eine ganze Reihe von Objekten eine längenproportionale Beteiligung der Chromosomen am Bruchgeschehen angegeben worden ist und haben selbst in unserem Falle ursprünglich mit einer solchen Verteilung nach Röntgenbestrahlung gerechnet. Wir halten aber unsere Ergebnisse nach nochmaliger kritischer Überprüfung für stichhaltig. Das SAT-Chromosom müßte somit strukturell etwas anders gebaut sein als die m-Chromosomen, ohne daß über die Art dieses Unterschiedes gegenwärtig weitere Spekulationen gerechtfertigt erschienen. Heterochromatin und Euchromatin waren nach unseren Untersuchungen etwa in gleicher Weise bei einer geringen Bevorzugung des ersten im Falle der m-Chromosomen an der röntgeninduzierten Bruchfrequenz beteiligt, so daß in dieser Richtung kaum weitere Aufschlüsse zu erhalten sind. Hingewiesen werden sollte in diesem Zusammenhang vielleicht noch auf eine Arbeit von BAKER (1949) bei *Drosophila virilis*, wo das Y-Chromosom nach Röntgenbestrahlung nur halb so häufig an Translokationen beteiligt war wie die gleich großen Autosomen. In der gleichen Richtung liegen Untersuchungen von MULLER und GERSHENSON (1935), MULLER, RAFFEL, GERSHENSON und PROKOFYEVA-BELGOVSKAYA (1937) und MULLER (1945), wonach die Brüche im X-Chromosom von *Drosophila melanogaster* nicht zufallsgemäß verteilt waren und die Übereinstimmung von Chromosomenlänge und Bruchfrequenz als reine Koinzidenz angesehen wird. Diese Schlüsse basieren im wesentlichen auf genetischen Analysen des X-Chromosoms.

Abschließend möge noch auf einen bedeutungsvollen Unterschied in der Verteilung durch Röntgenstrahlen und chemische Mutagene induzierter Translokationen hingewiesen werden, weil sich dabei ein in beiden Fällen grundsätzlich unterschiedlicher Mechanismus andeuten könnte. Nach Röntgenbestrahlung verteilten sich die Translokationen relativ gleichmäßig über die Chromosomen, während nach Einwirkung von chemischen Mutagenen eine starke Häufung in den heterochromatischen Segmenten erfolgte, so daß geschlossen wurde, Fusionen im Heterochromatin begünstigten den Austausch zwischen den Chromosomen erheblich (REVELL 1953, MICHAELIS und RIEGER 1958). Träten diese Fusionen tatsächlich ein und begünstigten den reziproken Chromatidenaustausch, wären für Röntgenstrahlen ähnliche Maxima zu erwarten. Diese fehlen ganz eindeutig. Da es kaum gerechtfertigt erscheint, für

Röntgenstrahlen und chemische Agenzien grundsätzlich verschiedene Translokationsmodi zu fordern, scheinen die Translokationsmaxima nach Einwirkung chemischer Mutagene nur durch eine echte Steigerung der Bruchfrequenz in den wahrscheinlich heterochromatischen Abschnitten bedingt zu sein. Für das Eintreten von Kontakten im Interphasekern zwischen den Chromosomen spricht aber auch im Falle der Röntgenstrahlen die Tatsache, daß in der Mehrzahl der Fälle (vor allem auch bei den m-Chromosomen) an identischen Orten der chromosomalen Längsstruktur befindliche Stellen an den zu Translokationen führenden Reunionen beteiligt sind. In dieser Richtung lassen sich gegenwärtig noch keine fundierten Aussagen machen, und es kam hier nur darauf an, den grundsätzlichen Unterschied in dieser Hinsicht zwischen den beiden Mutagengruppen und seine möglichen Konsequenzen anzudeuten.

Unsere Untersuchungen konnten im Hinblick auf die Verteilung röntgeninduzierter Brüche über die Chromosomen keine absolute Klärung bringen und haben darüber hinaus, besonders was die Bruchrelation SAT:m anbelangt, zu den bereits vorliegenden recht widerspruchsvollen Resultaten ein neues hinzugefügt. Es muß zukünftigen Arbeiten überlassen werden, weitere Befunde zur Längenproportionalität der Bruchfrequenz beizusteuern, um dieses Problem zu lösen. Unsere Ergebnisse scheinen dafür zu sprechen, daß der indirekten Wirkung ionisierender Strahlen eine erhebliche Bedeutung zukommt, da sich die unterschiedliche Beteiligung der SAT- und m-Chromosomen anders wohl kaum deuten lassen dürfte.

### Summary

1. The distribution of X-ray and chemically induced breaks over the 4 groups of morphologically distinguishable chromosomes of *Vicia faba* ( $2n=12$ ) was compared. X-ray induced breaks were distributed nearly at random with statistically significant minima at the ends and small maxima in the middle of the long arms of the small chromosomes, whereas there was a random break-distribution in the large SAT-chromosome. Concerning the distribution of breaks induced by an automutagenic, as yet chemically unidentified substance produced by anaerobiosis during soaking of seeds, there were statistically significant maxima in the middle of the long arms of the m-chromosomes and on both sides of the centromere of the SAT-chromosome when the breaks induced by the two mutagenic agents were compared.

2. The theoretical expectation of break-distribution between SAT- and m-chromosomes according to their length is approximately 2:5. We could not verify this relation for X-ray induced breaks, finding propor-

tions of 1,2:5,0 and 1,44:5,0 respectively. We therefore feel inclined to emphasize an important role of indirect action in case of X-rays. Possibly SAT- and m-chromosomes differ in structure and therefore react in different ways with the X-ray induced modified products of the chemical cell constituents.

3. Chromatid translocations induced by the automutagenic substance were more abundant in special regions. This crowding-effect did not appear after X-raying.

### Literatur

- CATCHESIDE, D. G., D. E. LEA and J. M. THODAY: The production of chromosome structural changes in *Tradescantia* microspores in relation to dosage intensity and temperature. *J. Genet.* **47**, 137—149 (1946).
- DARLINGTON, C. D., and L. F. LA COUR: Chromosome breakage and the nucleic acid cycle. *J. Genet.* **46**, 180—267 (1945).
- , and J. McLEISH: Action of maleic hydrazide on the cell. *Nature (Lond.)* **167**, 407—409 (1951).
- DEUFEL, J.: Untersuchungen über den Einfluß von Chemikalien und Röntgenstrahlen auf die Mitose von *Vicia faba*. *Chromosoma (Berl.)* **4**, 239—272 (1951).
- FORD, C. E.: Chromosome breakage in nitrogen mustard treated *Vicia faba* root tip cells. *Proc. VIII. Internat. Congr. Genet. Hereditas (Lund) Suppl.* 570—571 (1948).
- GILES, N. H.: Radiation-induced chromosome aberrations in *Tradescantia*. In: *Radiation Biology*, Vol. 1 (2), pp. 713—762. New York: McGraw Hill 1954.
- GOTTSCALK, W.: Untersuchungen am Pachytän normaler und röntgenbestrahlter Pollenmutterzellen von *Solanum lycopersicum*. *Chromosoma (Berl.)* **4**, 298—341 (1951).
- GRAY, L. H.: Biological actions of ionizing radiation. *Progr. Biophysics and Biophys. Chemistry* **2**, 240—305 (1951).
- JACKSON, W. D., and H. N. BARBER: Patterns of chromosome breakage after irradiation and ageing. *Heredity (Lond.)* **12**, 1—25 (1958).
- KAUFMANN, B. P.: Chromosome aberrations induced in animal cells by ionizing radiations. In: *Radiation Biology*, Vol. 1 (2), pp. 627—711. New York: McGraw Hill 1954.
- McLEISH, J.: The action of maleic hydrazide in *Vicia*. *Symp. on chromosome breakage. Heredity* **6**, Suppl. 125—147 (1953).
- MICHAELIS, A., u. R. RIEGER: Cytologische und stoffwechselphysiologische Untersuchungen am aktiven Meristem der Wurzelspitze von *Vicia faba* L. II. Präferentielle Verteilung der chromosomalen Bruch- und Reunionspunkte nach anaerober Quellung der Samen. *Chromosoma (Berl.)* **9**, 514—536 (1958).
- MULLER, H. J.: The non-equivalence of the blocks and the salivary "heterochromatin". *Genetics* **30**, 15 (1945).
- , and S. M. GERSHENSON: Inert regions of chromosomes as the temporary products of individual genes. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **21**, 69—75 (1935).
- , D. RAFFEL, S. M. GERSHENSON and A. A. PROKOFEVA-BELGOVSKAYA: A further analysis of loci in the so-called "inert region" of the X-chromosome of *Drosophila*. *Genetics* **22**, 87—93 (1937).
- NEWCOMBE, H. B.: The action of X-rays on the cell. I. The chromosome variable. *J. Genet.* **43**, 145—171 (1942).

- PÄTAU, K.: Eine neue  $\chi^2$ -Tafel. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre 80, 558—564 (1942).
- REVELL, S. H.: Chromosome breakage by X-rays and radiomimetic substances in *Vicia*. Symp. on chromosome breakage. Heredity 6, Suppl. 107—124 (1953).
- RIEGER, R., u. A. MICHAELIS: Cytologische und stoffwechselphysiologische Untersuchungen am aktiven Meristem der Wurzelspitze von *Vicia faba* L. I. Der Einfluß der Unterwasser-Quellung der Samen auf die chromosomale Aberrationsrate. Chromosoma (Berl.) 9, 238—257 (1958).
- SAX, K.: An analysis of X-ray induced chromosomal aberrations in *Tradescantia*. Genetics 25, 41—68 (1940).
- , and K. MATHER: An analysis of progressive chromosome splitting. J. Genet. 37, 483—490 (1939).
- SWANSON, C. P.: The effect of U.V.- and X-ray treatment on the pollen tube chromosomes of *Tradescantia*. Genetics 27, 491—503 (1942). — Cytology and cytogenetics. Englewood Cliffs, N.J.: Prentice-Hall, Inc. 1957.

Dr. R. RIEGER, Dr. A. MICHAELIS,  
Institut für Kulturpflanzenforschung Gatersleben Krs. Aschersleben

From the Department of Zoology, Central College, Bangalore (India)

## CYTOLOGICAL STUDIES OF INDIAN CHILOPODS

### I. THE CHROMOSOMES OF SOME SPECIES OF SCOLOPENDRIDAE (MYRIAPODA: CHILOPODA)

By

C. R. PUTTANNA

With 5 Figures in the Text

(Eingegangen am 24. Dezember 1958)

The *Chilopoda* have received scant attention from cytologists. OGAWA (1953) reviewing the earlier accounts of the chromosomes of Myriapoda (BLACKMANN 1903, 1905, 1907, 1910; MEDES 1905; OETTINGER 1908; BOUIN 1920, 1922, 1925) observes, "No accurate and clear-cut evidence has been presented for the morphology of chromosomes and the sex chromosome mechanism in any of these earlier investigations". MAKINO and NIYAMA (1942) and OGAWA (1950, 1951, 1952a, b, 1954, 1955, 1957) have more recently made some contributions to the chromosomes of this group but many Indian species have not been studied. It was with a view to filling the gap in our knowledge of the chromosomes of *Myriapoda* that this study was undertaken.

### Material and methods

The present study deals the chromosomes and meiotic phenomena in the males of five species belonging to three genera of the family *Scolopendridae*: viz., (a) *Scolopendra morsitans* (L.), (b) *Rhysida lithobioides* (NEWPORT), (c) *Rhysida nuda* (NEWPORT), (d) *Rhysida* sp., (e) *Ethmostigmus* sp. The animals were mostly collected in the vicinity of Bangalore (S. India), the specimens of *Ethmostigmus* in Hassan (about 150 miles from Bangalore). The testes were fixed in Allen's modified Bouin's fluid, Sanfelice's fluid and acetic-alcohol. Sections were cut at thicknesses varying from  $6\mu$  to  $25\mu$  and stained in iron-haematoxylin. Feulgen squashes were made of material fixed in acetic-alcohol and counter-stained with light-green.

### Observations

In all the species studied the male reproductive system reveals one basic pattern. The testes are in the form of ten pairs of spindle-shaped bodies which are connected to the main vas deferens by vasa efferentia at both ends. A characteristic feature of testis in *Scolopendridae* is the presence of fibrous material in which the germ cells are found. This is the first record of fibrous material in chilopod testis.

The primary spermatocytes are of two types. They are designated as A-type (bigger spermatocytes with more cytoplasm) and B-type (smaller spermatocytes with less cytoplasm). Meiosis, however, is similar in both.

*Scolopendra morsitans* (L.). Spermatogonial metaphases show 24 chromosomes (Fig. 1a). All the chromosomes appear as highly condensed spherical bodies. At this stage the sex-chromosomes are not distinguishable from autosomes.

The onset of meiotic prophase is marked by the appearance of the sex-chromosomes as positively heteropycnotic bodies. Some autosomes also show heteropycnotic ends. When the first meiotic spindle is formed,

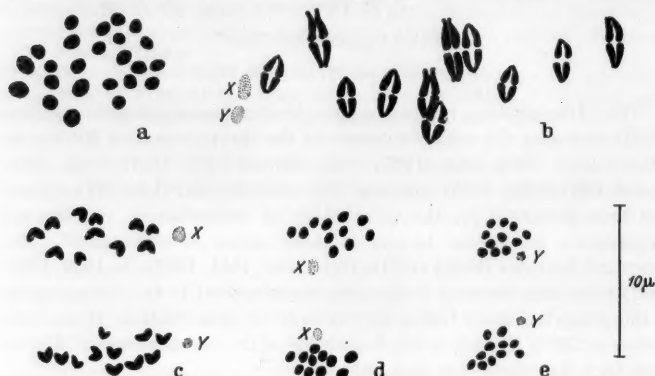


Fig. 1a—e. *Scolopendra morsitans*. a Spermatogonial metaphase,  $2n = 24$ . The chromosomes are spherical and highly condensed. b Metaphase I showing 12 bivalents. The X and Y show precocious segregation (aceto-carmine). c Anaphase I. X and Y segregate in the first division. d Anaphase II. X shows lagging. e Anaphase II. Y also shows lagging

the diakinetid nucleus is found at the equatorial region of the spindle. Later, the nuclear membrane is stretched toward the poles, with the result that the nucleus assumes a spindle-form. Finally the nuclear membrane ruptures at the equatorial region due to tension possibly produced by the stretching of the nuclear membrane. The poles appear to control the stretching and rupture of the nuclear membrane.

In metaphase I, 12 bivalents are seen (Fig. 1b), of which one is the sex-bivalent (XY). Anaphase I (Fig. 1c) separates X from Y which precede in the movement to the opposite poles. By mid-anaphase the autosomes catch up with the sex-chromosomes.

The interphase is of short duration. In the second division the sex chromosomes show lagging (Fig. 1d, e).

*Rhysida lithobioides* (NEWPORT). The diploid chromosome number as seen in gonial metaphases (Fig. 2a) is 18 (one pair of long chromosomes and 8 pairs of short rods). The sex-chromosomes are not distinguishable at this stage. During meiotic prophase the sex-chromosomes become

<sup>1</sup> All figures drawn at  $\times 3200$  and reproduced at  $\times 2400$ .

noticeable as heteropycnotic bodies. Metaphase I (Fig. 2b) shows 9 bivalents, of which one is the sex-bivalent (XY). In anaphase I, the X and Y behave as in *Scolopendra morsitans*.



Fig. 2a and b. *Rhysida lithobioides*. a Spermatogonial metaphase,  $2n = 18$ . Two autosomes are longer than the rest. b Metaphase I showing 9 bivalents. X and Y show precocious segregation

There is a distinct interphase. The sex-chromosomes do not reveal any differential behaviour from the autosomes in the second division.



Fig. 3a and b. *Rhysida nuda*. a Spermatogonial metaphase,  $2n = 18$ . Two autosomes are longer than the rest. b Metaphase I showing 9 bivalents. X and Y show precocious segregation

*Rhysida nuda* (NEWPORT). The chromosome number in gonial metaphases (Fig. 3a) is 18 (one pair of long chromosomes and 8 pairs of short rods). Metaphase I shows 9 bivalents (Fig. 3b), of which one



Fig. 4a and b. *Rhysida* sp. a Spermatogonial metaphase,  $2n = 16$ . Two autosomes are longer than the rest. b Metaphase I showing 8 bivalents. X and Y show precocious segregation

is the sex-bivalent (XY). Autosomes and sex-chromosomes segregate in the first division. The course of meiosis is similar to *Rhysida lithobioides*.



*Rhysida* sp. The chromosome number in spermatogonial metaphases is 16 (one pair of long chromosomes and 7 pairs of short rods) (Fig. 4a). Metaphase I (Fig. 4b) shows 8 bivalents, of which one is the sex-bivalent (XY). The course of meiosis is similar to the two species of *Rhysida* described above.

*Ethmostigmus* sp. The diploid chromosome number is 18 (one pair of long, 2 pairs of medium sized and 6 pairs of short chromosomes)

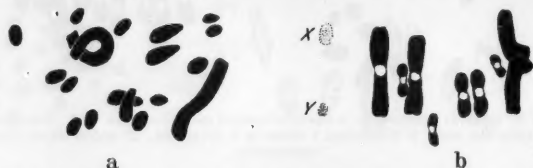


Fig. 5a and b. *Ethmostigmus* sp. a Spermatogonial metaphase,  $2n=18$ . b Metaphase I showing 9 bivalents. X and Y show also precocious segregation

(Fig. 5a). Metaphase I (Fig. 5b) shows 9 bivalents, of which one is the sex-bivalent (XY). The course of meiosis is not different from that of *Rhysida* described above.

#### General remarks

OGAWA (1953) observes that in *Scolopendra subspinipes mutilans* ( $2n:28$ ) and *Scolopendra subspinipes japonica* ( $2n:18$ ) the sex-chromosome mechanism is unknown. But a careful examination of the course of meiosis in five species belonging to *Scolopendridae* has revealed the occurrence of an XY-type of sex-chromosome mechanism in these forms. The X and Y form a regular bivalent which is distinguishable from autosomal bivalents by its size, heteropycnosis and behaviour. The behaviour of sex-chromosomes is identical during the first division in all the species studied. In *Scolopendra morsitans* the X and Y show lagging during the second division while such a differential behaviour has not been observed in other forms.

#### Summary

1. The chromosome numbers ranging from  $2n=16$  to 24 of five species of Chilopoda belonging to the family *Scolopendridae* have been described.
2. This is the first record of the sex-chromosome mechanism in the family *Scolopendridae*. The sex-chromosome mechanism is of the XY-type.
3. In the first division X and Y start their anaphasic movement first, but after a while, they slow down and the autosomes join them.
4. The sex-chromosomes in *Scolopendra morsitans* show lagging in the second division while their behaviour is normal in other species.

**Acknowledgments.** The author wishes to express his deep sense of gratitude to Prof. B. R. SESHACHAR, Department of Zoology, Central College Bangalore, for his guidance and criticism. The author is highly indebted to Dr. B. S. JANGI, Department of Zoology, College of Science, Nagpur (India), and to Dr. G. OWEN EVANS, Department of Zoology, British Museum (Natural History), London, for the identification of the forms used in the present study. Thanks are also due to the Ministry of Education, Government of India, for the award of a Senior Research Fellowship.

### Literature cited

(For references to the older literature comp. OGAWA 1953)

- MAKINO, S., and H. NIYAMA: The chromosomes of *Scolopendra damnosa* L. KOCH (*Chilopoda*). Jap. J. Genet. 18 (1942).
- OGAWA, K.: Chromosome studies in the *Myriapoda*. I. The chromosomes of *Thereuonema hilgendorfi* VERHOEFF (*Chilopoda*) with special regard to the post-reductional separation of the sex chromosomes. Jap. J. Genet. 25, 106—116 (1950). — II. On the chromosomal relationship between two allied species of *Scolopendra*. Pap. Coord. Committ. Res. Genet. 2, 17—21 (1951). — IV. The chromosomes of five species of *Chilopoda*. Pap. Coord. Committ. Res. Genet. 3, 35—39 (1952). — V. A chromosomal survey in some chilopods with a cytotaxonomic consideration. Jap. J. Genet. 25, 12—18 (1953). — VII. A chain-association of the multiple sex-chromosomes found in *Otocryptops sexspinosus* (Say). Cytologia 19, 265—272 (1954). — X. An X-2Y type of sex-determining mechanism found in *Otocryptops* sp. Annot. Zool. Japon. 28, 244—248 (1955). — XI. Remarkable abnormal divisions showing many poles in the first spermatocytes of *Otocryptops* sp. (*Chilopoda*). Zool. Mag. (Dobutsugaku Zasshi) 66, 17 to 19 (1957).

C. R. PUTTANNA c. o. Prof. Dr. B. R. SESHACHAR,  
Department of Zoology, Central College, Bangalore (India)

Aus dem Zoologischen Institut der Universität Tübingen

**POLYPLOIDIE UND SOMATISCHE REDUKTION IN DER  
LARVENEPIDERMIS VON AEDES AEGYPTI L. (CULICIDAE)\***

Von

HELMUT RISLER

Mit 20 Textabbildungen

(Eingegangen am 22. November 1958)

**A. Einleitung**

In der Entwicklung der Insekten tritt weitverbreitet die endomitotische Polyploidisierung (GEITLER 1953) der Zellen im Verlaufe des Gewebewachstums an die Stelle der mitotischen Zellvermehrung. Bestimmte Gewebe, Zellgruppen oder auch Einzelzellen (Drüsen, Mitteldarm, Oenocyten, Tracheenendzellen, trichogene Zellen der Epidermis u. a.) stellen ihre Mitosentätigkeit ein, nachdem sie ihre somatische Funktion aufgenommen haben (RISLER 1954). In ihnen führen Endomitosen (GEITLER 1938) zu einer jeweiligen Verdoppelung der Chromosomenzahl, ohne daß eine Spindel gebildet wird und ohne nachfolgende Zellteilung. Der Formwechsel der Chromosomen kann in diesen Endomitosen demjenigen der Mitose sehr ähnlich sein (GEITLER 1939, PAINTER und REINDORF 1939, LIPP 1953, 1955, BIER 1957 u. a.). Auch bei anderen Tieren und bei Pflanzen wurde die endomitotische Polyploidisierung als reguläre Entwicklungserscheinung nachgewiesen (s. GEITLER 1953). Die Endomitosen haben entsprechend der durch sie hervorgerufenen Verdoppelung der Chromosomenzahl ein jeweiliges Größenwachstum der Zellkerne und Zellen zur Folge, welche in einer rhythmischen Volumenverdoppelung oder anderen Wachstumsschritten zum Ausdruck kommt. Da die Chromosomenzahl während eines derartigen Wachstums im allgemeinen unmittelbar nicht festzustellen ist, kann das Ausmaß der Polyploidisierung oftmals nur aus der Größe der Zellkerne geschlossen werden. In günstigen Fällen gestattet jedoch die Ruhekerntstruktur eine direkte Bestimmung (GEITLER 1937). Eine sehr wertvolle Ergänzung der genannten Methoden stellt die spektrophotometrische Untersuchung feulgengefärbter Zellkerne dar (POLLISTER und RIS 1947). Eine Verdoppelung der Chromosomenzahl führt auch zu einer entsprechenden Mengenzunahme der DNS (z. B. O'BRIEN 1956).

Neben dem Gewebewachstum durch mitotische Zellvermehrung und dem rein endomitotischen Wachstum bestimmter Zellen und Gewebe gibt es einen Zwischentyp (GEITLER 1939, RISLER 1954), welcher durch das Auftreten *polyploider Mitosen* gekennzeichnet ist. In Geweben dieser

\* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Art stellen die Zellen ihre Teilungstätigkeit nicht ein. Es schalten sich aber unter Umständen Endomitosen zwischen die Mitosen, deren Ergebnis die folgenden Teilungen mit verdoppelter Chromosomenzahl anzeigen. Der Grad der Polyploidisierung ist in diesen Fällen jedoch nicht so hoch wie bei rein endomitotischem Wachstum, bei dem 1024 oder noch höhere Stufen einer Verdoppelungsreihe keine Seltenheit sind. Über die 64fache Chromosomenzahl scheint die Polyploidisierung teilungsfähiger somatischer Zellen nicht hinauszugehen (Hinterdarm von Culiciden: HOLT 1917, BERGER 1938). Polyploide Mitosen sind bisher, wie die polyploiden Zellkerne des rein endomitotischen Typs, fast ausschließlich in Geweben gefunden worden, deren histologische Differenzierung abgeschlossen ist. In ihnen treten Mitosen nur noch während der sog. Mitosenperioden auf, die im Rhythmus der Häutungen in der postembryonalen Entwicklung der Insekten hormonal ausgelöst werden (KÜHN und PIEPHO 1936). Polyploide Mitosen wurden in somatischen Geweben von folgenden Insektengruppen gefunden: Thysanuren (E. FEUCHT 1959), Odonaten (T. OKSALA 1939), Orthopteren (eigene Beobachtungen), Schaben (*Blattidae*) (BAUDISCH 1956), Hemipteren (BUCHNER 1955, GEITLER 1939, HUGHES-SCHRADER 1930, LIPP 1953, O'BRIEN 1956), Hymenopteren (MEVES 1907, SANDERSON 1933, SANDERSON und HALL 1948, RISLER 1954), Coleopteren (EILERS 1925), Lepidopteren (GEITLER 1940, RISLER 1950) und Dipteren (BERGER 1938, FROLOWA 1926, 1929, HOLT 1917, METZ 1916). Man kann also erwarten, daß auch dieser dritte Typ des Gewebewachstums ganz allgemein bei den Insekten vorkommt.

Ein Fall polyploider Mitosen hat ganz besonderes Interesse erweckt. Die Zellkerne des Dünndarmepithels (Ileum) von *Culex pipiens* und anderen Culiciden wachsen die ganze Larvenentwicklung hindurch ohne sich zu teilen. Zwar wurden Endomitosen nicht beobachtet, doch zeigen die von HOLT (1917) gefundenen bis zu 64-ploiden Mitosen, die kurz nach der Verpuppung hier auftreten, daß sich die Zellkerne endomitotisch polyploidisiert haben. Nunmehr werden sie unter starker Vermehrung in mehreren unmittelbar aufeinanderfolgenden Kernteilungen wieder tetra- bis oktoploid. BERGER (1938) nannte diese von ihm entdeckte Erscheinung „somatische Reduktion“ (somatic reduction). Sie leitet den Umbau des larvalen in den imaginalen Dünndarm ein. Zu gleicher Zeit findet man auch in den anderen ektodermalen Teilen des Darmtrakts, mit Ausnahme eines bestimmten rektalen Abschnittes, dessen Kerne besonders groß sind und polytäre Chromosomen besitzen, derartige Kernteilungsfolgen. Beobachtungen bei Untersuchungen über die somatische Cytologie des Schmetterlings *Ptychopoda seriata* (RISLER 1950) und der Honigbiene *Apis mellifica* (RISLER 1954) lassen es möglich erscheinen, daß auch in der Metamorphose anderer holometaboler Insekten die somatische Reduktion eine Rolle spielt.

Die vorliegende Untersuchung über die Polyploidie in der Epidermis der *Aedes*-Larven leitet eine Reihe von Arbeiten ein, welche sich mit der entwicklungsgeschichtlichen Bedeutung der somatischen Polyploidie bei den Insekten befassen. Neben einer allgemeinen Verbreiterung des Wissens auf diesem Gebiet soll vor allem die Rolle geklärt werden, welche die *endomitotische Polyploidisierung teilungsfähiger Zellen* spielt. Ihre Bedeutung für die Größendifferenzierung bei der Entwicklung der verschiedenen Bienen-Morphen wurde in einer früheren Arbeit (RISLER 1954) dargelegt. Die Wahl fiel auf eine Culicide, weil der Prüfung fraglicher Fälle von *somatischer Reduktion* bei anderen Insektengruppen eine gründliche eigene Kenntnis dieser Vorgänge bei einem schon bekannten Beispiel zugrunde gelegt werden sollte. Außerdem ist es durchaus wahrscheinlich, daß sich die Metamorphose der Culiciden nicht nur im Darmtrakt der somatischen Reduktion bedient. Eine eingehende Behandlung weiterer Gewebe von *Aedes aegypti* soll folgen.

### B. Material und Technik

Das Tiermaterial, Larven und Puppen von *Aedes aegypti* L., stammte aus Zuchten, welche im Zoologischen Institut der Universität Tübingen für physiologische Untersuchungen gehalten werden. Die zuvor trocken aufbewahrten Eier wurden in Petrischalen bei 25°C Zuchttemperatur im Thermostaten zur Entwicklung gebracht. Die Eilarven wurden unmittelbar nach dem Auskriechen abgefangen und annähernd gleichaltrige Tiere gruppenweise aufgezogen. Auch jeweils bei den Häutungen, deren Vollzug die zunächst farblosen Kopfkapseln anzeigen, wurden die Tiere abgefangen, um eine eindeutige Bestimmung des Alters bzw. des Larvenstadiums zu ermöglichen. Als Futter dienten Stücken von Schweineleber. Drei Larvenhäutungen teilen das Larvenleben in 4 Larvenstadien ein, deren erstes und zweites je etwa 1 Tag, deren drittes 1½ und deren letztes 4–6 Tage dauert, wie schon W. TRAGER (1937) angegeben hat.

Im letzten Stadium ist die Variabilität der Entwicklungsgeschwindigkeit besonders stark. Das relative Alter der Larven kann man jedoch an den histologischen Veränderungen der Epidermis feststellen.

Die Untersuchungen wurden durchweg an Schnittpräparaten vorgenommen. Larven und Puppen aller Altersstufen wurden mit Carnoy fixiert (wobei es darauf ankam, vor allem die Mitosenperioden zu erfassen), über Methylbenzoat und Benzol in Paraffin (Schmelzpunkt 58°C mit einer Beimischung von 5% Bienenwachs) eingebettet und 8 µ dick geschnitten. Zur Färbung diente die Feulgensche Nuklealreaktion (Hydrolyse 4 min); teilweise wurde mit Lichtgrün gegengefärbt.

In den meisten Fällen war es besonders günstig, im Phasenkontrastverfahren zu mikroskopieren. Hierbei treten neben den sehr dichten Chromosomen auch die für die Beurteilung der Kernwertigkeit wichtigen Nukleolen und die Spindelstrukturen deutlich hervor. Die mikrophotographischen Abbildungen sind sämtlich mit dem Photomikroskop von Zeiss aufgenommen. (Filmmaterial Adox KB 14, Entwicklung mit Rodinal 1:50.) Für die Kernmessungen wurden die Kernumrisse aus Tangential-schnitten an die Epidermis mit dem Zeichenspiegel herausgezeichnet und die Fläche der Kernbilder berechnet. Das Wachstum der linsenförmigen Epidermiskerne drückt sich auf Grund ihrer sehr flachen Gestalt bei einer solchen Betrachtung besonders stark aus (s. S. 193). Für die Darstellung der Meßergebnisse wurde der Logarithmus der Meßwerte gewählt, ein Verfahren, auf dessen Vorzüge bei derartigen Untersuchungen HINTZSCHE (1945) hingewiesen hat (Größenklassen je 0,05).

## C. Ergebnisse

### 1. Die Histologie der Epidermis

Die Epidermis der Larven ist ein sehr flaches Plattenepithel mit linsenförmigen Kernen, die in der Aufsicht, d. h. in Tangentialanschnitten des Gewebes, annähernd kreisrund erscheinen (Abb. 1). Nur an wenigen Stellen verdickt sie sich soweit, daß sie eine kugelförmige Gestalt der Zellkerne zuläßt, so etwa in den Imaginalanlagen (Abb. 1 d), den Borstengruben des Labrums und der Mandibeln, oder in der Nachbarschaft großer Haare.

Die Cuticula ist an Thorax und Abdomen außerordentlich dünn und farblos (Abb. 8a, *Cut*) und wird von sehr feinen leistenartigen Verdickungen durchzogen. Nur den Kopf und das Abdomen stützt eine kräftige, sklerotisierte Cuticula. Die Puppencuticula ist dagegen durchweg sklerotisiert. Die oft mehrgeteilten Haare bzw. Borsten haben ihre Basis in üblicher Weise in einer trichogenen Zellgruppe, die jeweils aus einer Haarbildungs- und einer Balgzelle besteht. Die Kerne dieser beiden Zellen sind entsprechend der Haargröße verschieden groß. Ihr endomitotisches Wachstum zeigt sich bei besonders großen Haarbildungskernen, welche nur in Larven vorkommen, an dem Auftreten von Riesenchromosomen. Bei kleinen Haaren dagegen können die Bildungskerne sogar kleiner sein als die benachbarten Epidermiskerne.

### 2. Zellkernwachstum und somatische Reduktion

#### a) Vorbemerkung

Im folgenden soll das *Wachstum der Epidermiskerne* beschrieben werden. Dabei bleiben die trichogenen Zellen unberücksichtigt. Ein Teil der Haare wächst stufenweise mit den Häutungen sehr stark heran, andere bleiben dagegen klein. Die Kerne wachsen entsprechend. Auch die Zellen der *Muskelsprungs-* und *Ansatzstellen*, die durch die Ausbildung von Tonofibrillen gekennzeichnet sind, wachsen ohne sich zu teilen. Im Gegensatz zu den Verhältnissen bei *Apis mellifica* (RISLER 1954) wurden an diesen Stellen keine polyploiden Mitosen gefunden. Auch ihr Schicksal wurde nicht im einzelnen verfolgt. Sie sind im 4. Larvenstadium mindestens oktaploid.

Die normalen, nicht besonders differenzierten Epidermiszellen teilen sich jeweils nur während der Mitosenperioden, die schon wenige Stunden nach vollzogener Häutung einsetzen. In den Imaginalanlagen sind dagegen immer Mitosen zu finden.

Im Zuge der Arbeit erwies es sich als zweckmäßig, für die vergleichende Untersuchung bestimmte Epidermisbezirke herauszugreifen. Dies gilt vor allem für die Kernmessungen. Wegen des dort am stärksten ausgeprägten Kernwachstums wurden hierfür die Tergalbereiche der Segmente des Abdomens ausgewählt, allerdings mit Ausnahme des letzten, das sich, wohl auf Grund der Sklerotisierung der Cuticula — ebenso wie die Kopfkapsel —, hinsichtlich des Wachstums anders verhält als die sehr dehnungsfähige übrige Abdominalepidermis.

#### b) Das erste Larvenstadium

Die Zellkerne der Epidermis sind im 1. Larvenstadium sehr klein. Abb. 1a zeigt sie in der Eilarve, Abb. 1b während der Mitosenperiode. Im Inneren der Ruhekerne liegt ein kugeliger Nukleolus, an ihm ein größeres Chromozentrum. Die Kurve der Kernflächen (Abb. 2) hat

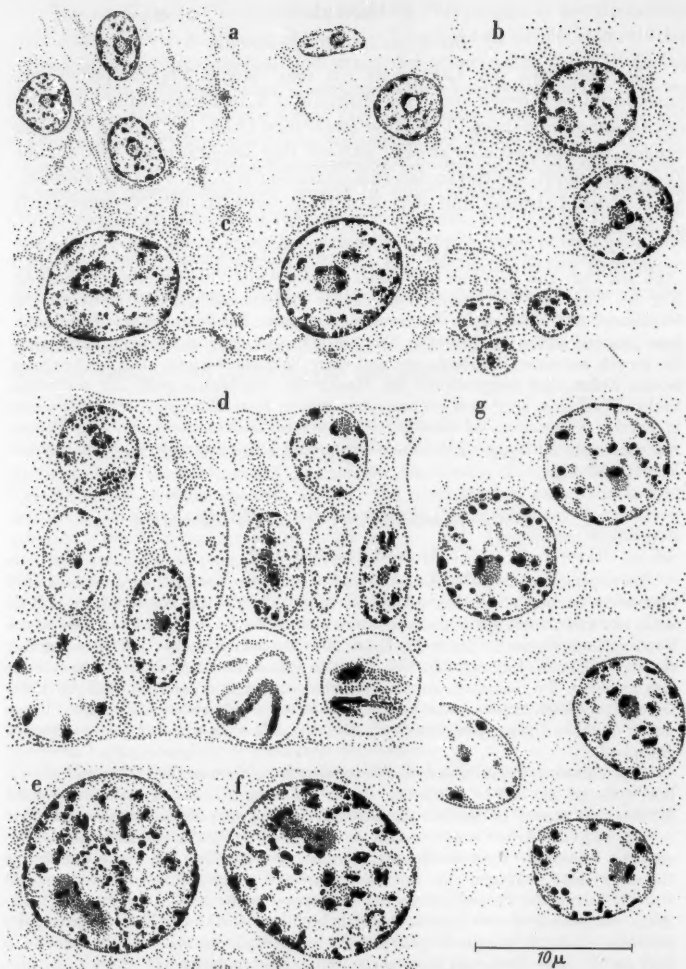


Abb. 1a—g. Zellkerne aus Tangentialanschnitten der Epidermis: a am Anfang, b während der Mitosenperiode des 1. Larvenstadiums, c im 2. Larvenstadium; d in einer Imaginalanlage des Thorax im 4. Larvenstadium; e, f während der Mitosenperiode des 3. Larvenstadiums (tetraploid); g am Ende des 4. Larvenstadiums (diploid)

gegen Ende des 1. Stadiums ihren Hauptgipfel bei etwa  $25 \mu^2$ , daneben aber einen weiteren links davon, der zeigt, daß ein Teil der Kerne klein



geblieben ist. Solche kleinen Kerne liegen auch in Abb. 1b neben den normalen Epidermiskernen. Möglicherweise handelt es sich um Zell-

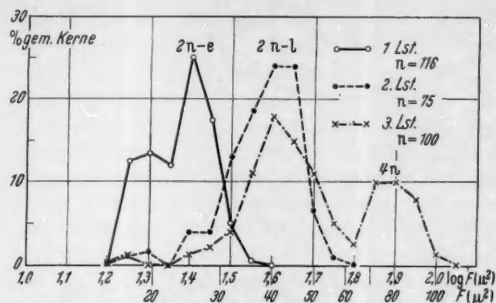


Abb. 2. Zellkerngrößen ( $F$  Kernfläche), 1.—3. Larvenstadium

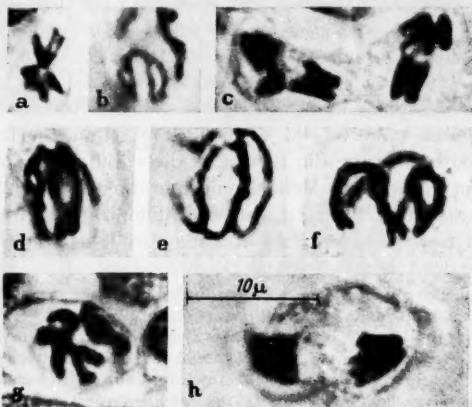


Abb. 3a—h. Diploide Mitosen: a, b 1. Larvenstadium; c Imaginalanlagen, d—h in der normalen Epidermis



Abb. 4a—c. Diploide Mitosen: a in einer Imaginalanlage (embryonal-diploid); b, c in der normalen Epidermis (larval-diploid)

kerne noch nicht ausdifferenzierter Epidermiszellen, wie sie später in den Imaginalanlagen zu finden sind.

Die Mitosenbilder lassen die diploide Chromosomenzahl erkennen (Abb. 3a und b). Sechs meta- bis submetazentrische Chromosomen ordnen sich zu 3 Paaren in der Äquatorialplatte an, entsprechend der für die Dipteren typischen Homologenpaarung (METZ 1916).

#### c) Das zweite Larvenstadium

Im Anschluß an die 1. Mitosenperiode beginnt ein neues starkes Zellkernwachstum, das über das normale Teilungswachstum hinausgeht. Der Hauptgipfel der Kerngrößenkurve verschiebt sich dementsprechend und liegt zu Beginn der 2. Mitosenperiode (Abb. 2), also im 2. Larvenstadium, bei etwa  $40 \mu^2$ . Zwei Nebengipfel bei  $25 \mu^2$  und unterhalb  $20 \mu^2$  sind aber noch zu erkennen. Die Ruhekernstruktur hat sich bei den größeren Zellkernen nicht wesentlich geändert (Abb. 1c). Der Nukleolus ist weiterhin kugelförmig. Das ihm anliegende größere Chromozentrum (Abb. 1c, linker Kern) und ein zweites innerhalb des Kernraums sind deutlich zu erkennen. Man hat den Eindruck, daß diese Chromatin-elemente größer geworden sind. An der relativen Dichte des Ruhekernchromatins hat sich, soweit dies ein Vergleich der Kernbilder erkennen läßt, kaum etwas geändert. Die diploide Chromosomenzahl ist auch in den nunmehr entsprechend der Kerngröße größeren Teilungsbildern erhalten geblieben (Abb. 3d—h, 4b u. c). Die Chromosomen scheinen größer geworden zu sein. Ein Beweis für diese Auffassung läßt sich jedoch mit den angewandten Methoden nicht erbringen. In den Imaginalanlagen machen die Zellkerne dieses Wachstum nicht mit (Abb. 3c, 4a). Dort findet man weiterhin Mitosen, deren Größe derjenigen der Epidermiskerne des 1. Larvenstadiums gleicht.

Dieses Ergebnis entspricht den Befunden, die bei Untersuchungen an *Ptychopoda seriata* (RISLER 1950) und *Apis mellifica* (RISLER 1954) gemacht wurden. Bei beiden verdoppelt sich das Kern- bzw. das Zellvolumen zwischen der Mitosenperiode des 1. und 2. Larvenstadiums, ohne daß sich dabei die Chromosomenzahl verdoppelt. Auch dort wachsen die Zellkerne jedoch nur in den ausdifferenzierten larvalen Epidermiszellen und nicht in den undifferenzierten Imaginalanlagen. Analog zu den Verhältnissen bei *Apis mellifica* werden im folgenden die kleinen diploiden Kerne und Mitosen als *embryonal-diploid* (2n-e), die großen als *larval-diploid* (2n-l) bezeichnet.

#### d) Das dritte Larvenstadium

Auch in diesem Stadium findet wiederum, allerdings nur bei einem Teil der Zellkerne, ein starkes Wachstum statt. Das Ausmaß dieser Kernvergrößerung zeigen Abb. 1e, f. Sehr deutlich wird der Größenunterschied auch in den Mikroaufnahmen Abb. 5a (2n-l) und b (4n). Ein neues Maximum der Kernflächen (Abb. 2) bei etwa  $80 \mu^2$  läßt erkennen, daß neben die beiden diploiden Kerngrößenklassen eine neue getreten ist. Die Struktur der Ruhekerne weist einige deutliche Unter-

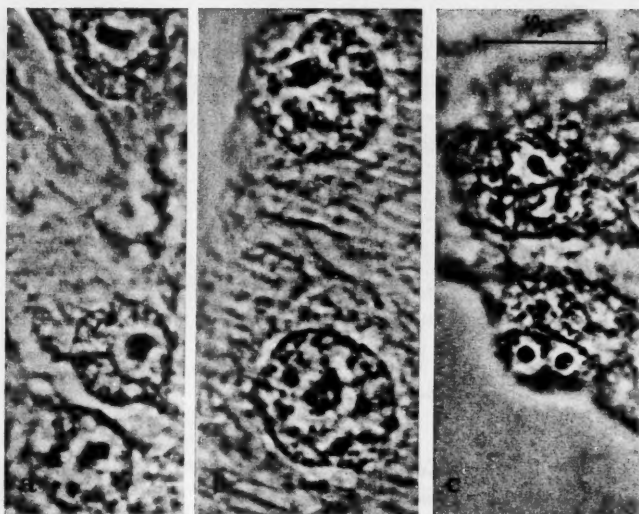


Abb. 5a—c. Zellkerne im 3. Larvenstadium: a diploid; b tetraploid; c tetraploid nach der Mitosenperiode (2 Nukleolen)

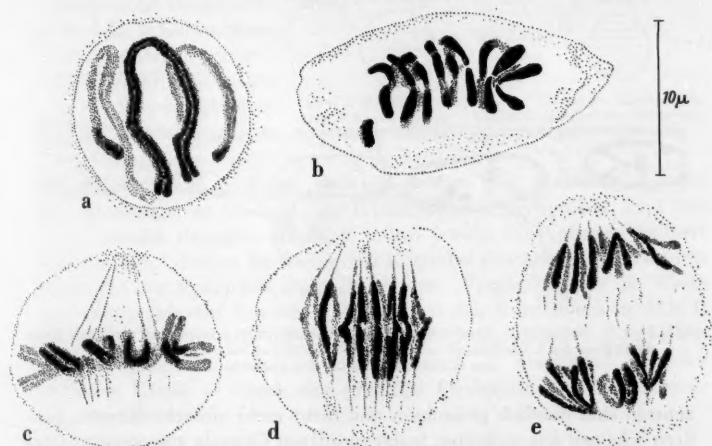


Abb. 6a—e. Tetraploide Mitosen: a Prophase; b, c Metaphase; d, e Anaphase

schiede gegenüber derjenigen diploider Kerne auf. Der Nukleolus ist nicht mehr kugelig, sondern unregelmäßig geformt (Abb. 1 e, f). Oftmals

hat er Hantelgestalt und unmittelbar nach der Mitosenperiode findet man 2 Nukleolen (Abb. 5c). In den großen Kernen ist der dort unregelmäßige Nukleolus demnach ein Verschmelzungsprodukt. Die Chromo-

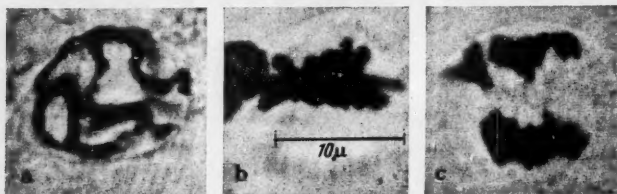


Abb. 7a—c. Tetraploide Mitosen im 3. Larvenstadium: a Prophase; b Metaphase; c Anaphase

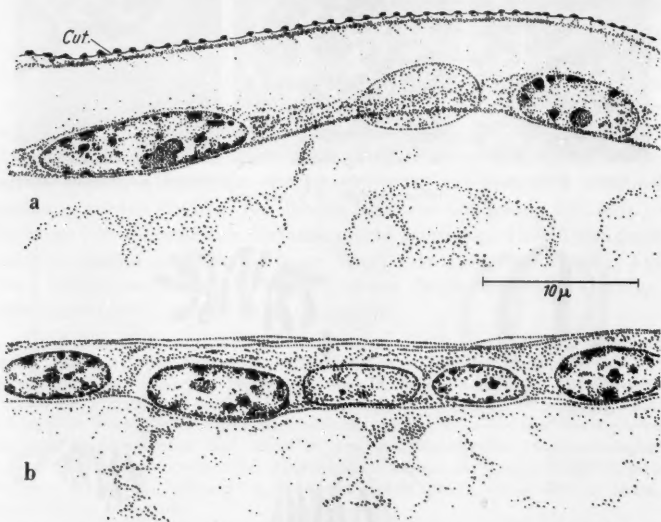


Abb. 8a u. b. Zellkerne in Schnitten senkrecht zur Epidermis: a tetra- und diploider Kern zu Beginn des 4. Larvenstadiums; b diploide Zellkerne nach der Mitosenperiode des 4. Larvenstadiums; Cut Cuticula

zentren sind deutlich gewachsen und nicht mehr einfache Körper, sondern scheinen aus mehreren feulgenpositiven Granula zusammengesetzt zu sein. Die Mitose beweist, daß diese großen Zellkerne *tetraploid* sind (Abb. 6). In der Prophase liegen die homologen Chromosomen meist so eng gepaart, daß sie als drei einfache, aber relativ dicke Chromosomen sichtbar werden (Abb. 6a, 7a). Zur Äquatorialplatte ordnen sich die

12 Chromosomen in Gruppen von je vier nahezu in einer Ebene an (Abb. 6b u. c, 7b). Auch in der Anaphase (Abb. 6d—e, 7c) kann man die Chromosomenzahl gut feststellen, weil die Zellen sich während der Teilung nicht abkugeln, sondern sehr flach bleiben.

#### e) Die Größenunterschiede der drei Kernklassen

Das Größenwachstum der Zellkerne geht bei annähernd gleicher Epitheldicke vor sich, d.h. die Kerndurchmesser senkrecht zur Epidermis bleiben fast gleich.

Abb. 8a zeigt nebeneinander einen diploiden (rechts) und einen tetraploiden Epidermiskern im Schnitt. Auch der Durchmesser der sehr viel enger liegenden Kerne am Ende des 4. Larvenstadiums ist nicht wesentlich größer (Abb. 8b). Die verschiedenen Kerngrößen sind in Abb. 9 schematisch dargestellt: links die Kernumrisse und schraffiert die Schnittbilder dieser Kerne, rechts jeweils Kugeln gleichen Volumens. Die Werte für den tetraploiden Kern

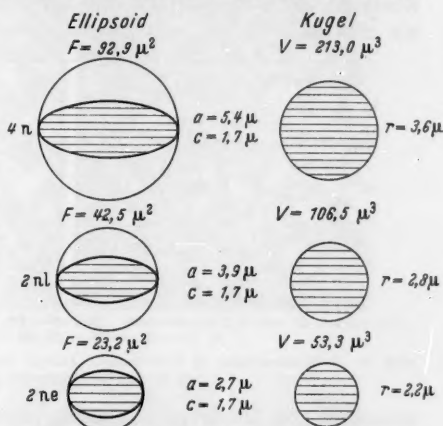


Abb. 9. Kerngrößenschema:  $F$  Fläche der Kernprojektion,  $V$  Kernvolumen,  $a$  Radius tangential zur Epidermis,  $c$  Radius senkrecht zur Epidermis,  $r$  Kugelradius

sind unmittelbar gemessen und entsprechen dem Maximum 4n der Kerngrößenskurven (Abb. 2). Die beiden anderen Kerngrößen, 2n-l und 2n-e, wurden dagegen errechnet, indem jeweils das Volumen halbiert und aus dem Volumen die Radien der Kerne bei gleichbleibendem Radius senkrecht zur Epidermis ermittelt wurden. Vergleicht man die Werte und Bilder mit den Kurven in Abb. 2 und den Kernbildern in Abb. 1, dann sieht man die sehr schöne Übereinstimmung. Die drei gefundenen Größenklassen unterscheiden sich demnach — ausgehend von der kleinsten Klasse — durch eine jeweilige Verdoppelung ihres Volumens voneinander.

#### f) Das vierte Larvenstadium

Das 4. Larvenstadium übertrifft die vorhergehenden an Dauer ganz erheblich. Das zu Beginn noch starke Größenwachstum der Tiere läßt schnell nach (s. S. 203). In den meisten Geweben beginnt nunmehr die

Metamorphose. Die Imaginalanlagen nehmen an Umfang zu, zahlreiche Mitosen zeigen ihr rasches Wachstum.

Die Zellkerne der Epidermis werden vor der 4. Mitosenperiode in den abdominalen Tergalbereichen fast durchweg tetraploid. Aber auch an anderen Stellen, mit Ausnahme der Intersegmentalhäute, findet man tetraploide Kerne. Dementsprechend wird der tetraploide Gipfel der Kerngrößenkurve zum Hauptgipfel (Abb. 10). Daß er sich noch etwas weiter nach rechts verschoben hat, liegt möglicherweise daran, daß die Kerne sich weiter abgeplattet haben. Jedenfalls sind diese großen Kerne, wie man in der schon bald einsetzenden 4. Mitosenperiode erkennt,

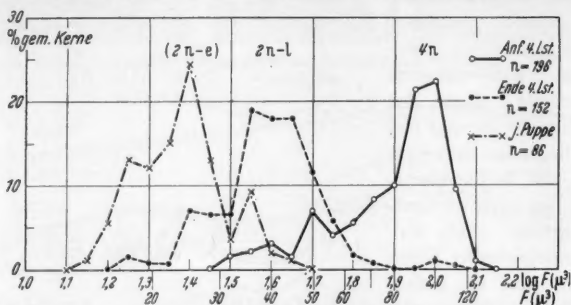


Abb. 10. Zellkernvolumen ( $F$  Kernfläche), Anfang und Ende des 4. Larvenstadiums und Anfang des Puppenstadiums

tetraploid. Die Mitosenperiode dauert relativ sehr lange. Noch nach 60–70 Std sind unter den gewählten Zuchtbedingungen zahlreiche Mitosen zu finden. Vergleicht man die Kerngrößen zu Beginn und die am Ende des Larvenstadiums miteinander (Abb. 1e, f mit g; Abb. 8a u. b; Abb. 11a u. b), so fällt die starke Größenabnahme auf. Die Kerngrößenmessungen zeigen, daß sich das Hauptmaximum wieder in den diploiden Bereich verlagert hat. Nur noch wenige Werte liegen in der tetraploiden Größenklasse (Abb. 10).

Nicht nur die Dauer, sondern auch der Verlauf der Zellteilungen dieser Mitosenperiode ist ganz anders als in den ersten Larvenstadien. Deutlich erkennt man, daß viele Zellkerne nicht nur eine einzige Teilung durchmachen, um dann wieder zu Ruhekernen zu werden, sondern daß einander unmittelbar mehrere Mitosen folgen, die zu einer sehr starken Kernvermehrung führen. Die Auszählung von Kernen in gleichgroßen Epidermisstücken läßt vermuten, daß die Kernzahl sich ungefähr verachtfaht. Dies würde bedeuten, daß 3 Teilungsschritte nacheinander ablaufen. Aus der Ruhekernstruktur, d.h. vor allem aus der Form des Nukleolus, ist zu entnehmen, daß die Kerne nach Abschluß der Teilungen diploid sind (Abb. 1g, Abb. 11b).

Die Mitosen des 4. Larvenstadiums wurden eingehend untersucht. Zu Beginn, etwa 3 Std nach der Häutung, liegen die Kerne noch weit

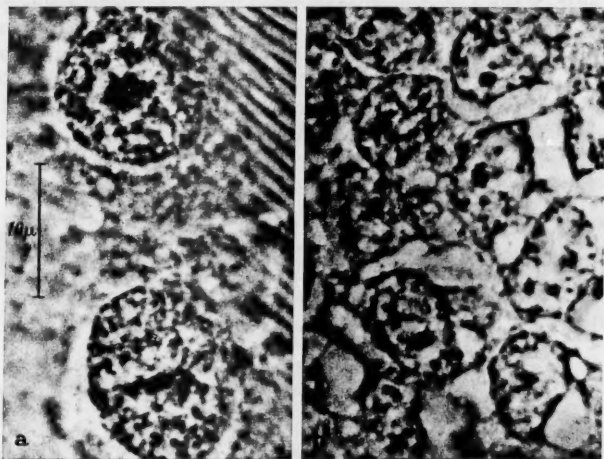


Abb. 11a u. b. Zellkerne im 4. Larvenstadium: a tetraploid vor der Mitosenperiode  
b diploid nach der Mitosenperiode

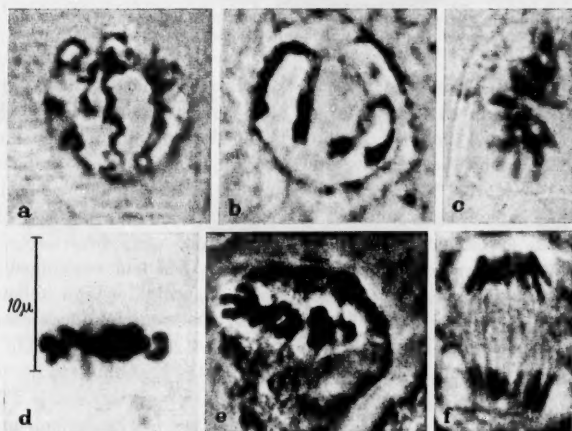


Abb. 12a—f. Tetraploide Mitosen am Anfang der 4. Mitosenperiode: a, b Prophase;  
c—e Metaphase; f Anaphase

auseinander. Die anfangs beobachteten Mitosen (Abb. 12) sind in gleicherweise tetraploid wie im 3. Larvenstadium: Die Metaphasechro-



mosomen liegen nahezu in einer Ebene (Abb. 12c—e). Auch die Anaphase gleicht derjenigen des vorhergehenden Larvenstadiums (Abb. 7c, Abb. 12f). Schon kurz darauf jedoch sehen die Chromosomenkonfigurationen ganz anders aus. In den Prophasen, die kleiner erscheinen als diejenigen normaler tetraploider Teilungen (die Größe schwankt, wie Größenmessungen gezeigt haben, erheblich), sind die homologen Elemente nicht mehr eng gepaart, sondern sie teilen sich und lassen so ihre Zusammensetzung aus vier selbständigen Partnern meist klar erkennen

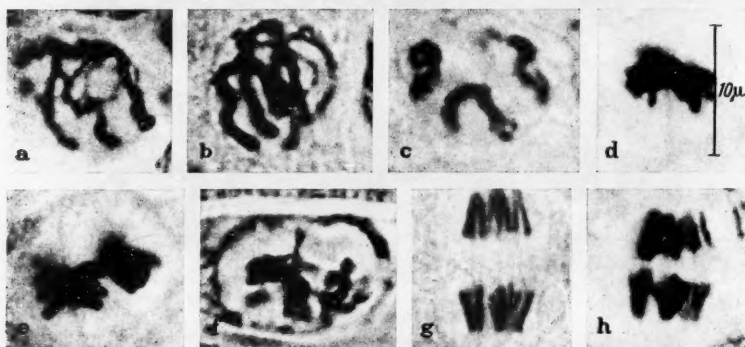


Abb. 13a—h. Tetraploide Mitosen (somatische Reduktion) in der Mitte der 4. Mitosenperiode: a—c Prophase; d—f Metaphase; g, h Anaphase

(Abb. 13a u. b, Abb. 14a). Auch in der Prometaphase trennen sie sich wenigstens an ihren Enden (Abb. 13c). In der Äquatorialplatte legen sich die Chromosomen nicht mehr nebeneinander in eine Ebene, sondern sie ordnen sich übereinander in der Längsrichtung der Spindel an (Abb. 13d—f, Abb. 14b—d). Die Spindelansatzstellen sind hierbei einander besonders stark genähert. Die Chromosomenfasern der Spindel erscheinen auffallend kompakt, wohl deshalb, weil sich, infolge der Lagerung der Zentromeren, diese Fasern zu Bündeln vereinigen (Abbildung 13a, f, Abb. 14c). Auch die Anaphasenbilder sind anders als diejenigen der ersten tetraploiden Mitosen. Die auseinanderweichenden Chromosomen bleiben zu 3 Bündeln geordnet, die die tetraploide Zahl nicht mehr deutlich erkennen lassen (Abb. 13g, h, Abb. 14g, h). Günstige Bilder lassen den Schluß zu, daß diese Gruppen nur aus je 2 Chromosomen bestehen. Außerdem nähert sich ihre Größe derjenigen normaler diploider Mitosen (Abb. 14i, k); sie sind aber noch deutlich größer als diese. Bemerkenswert ist die Anordnung von Zellkernen und Teilungsfiguren gleichen Stadiums zu Zweiergruppen (Abb. 14e u. f, Abb. 15a u. b), in späteren Phasen der Mitosenperiode zu Nestern mit

höherer Zellenzahl (Abb. 15c). In mehreren Fällen konnte zwischen 2 Zellen, deren Kerne am Ende einer Telophase, in einer Interphase mit 2 Nukleolen oder sogar in der Prophase für eine folgende Teilung stan-

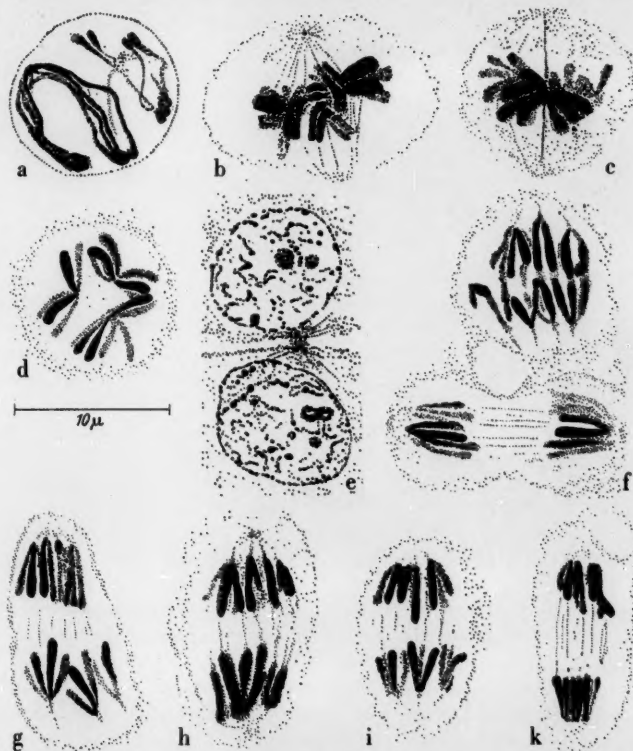


Abb. 14a—k. Mitosen während der 4. Mitosenperiode (somatische Reduktion): a Prophase; b—d Metaphase; e Kernpaar mit Restspindel (in früher Prophase); f Zweiergruppe (frühe und späte Anaphase); g, h Anaphase; i, k diploide Anaphasen am Ende der Mitosenperiode

den, der Rest der Spindel der vorhergehenden Mitose gefunden werden (Abb. 14e). Zwei Teilungen folgen also unmittelbar aufeinander, getrennt durch ein kurzes Ruhekerntadium, bei dem die Nukleolen gebildet werden. Gegen Ende der Mitosenperiode findet man nur noch diploide Mitosen (Abb. 15d u. e).

Aus dem Verlauf dieser 4. Mitosenperiode kann man den Schluß ziehen, daß die tetraploiden Kerne in einer Folge von mindestens zwei,

vermutlich aber 3 Teilungsschritten zu diploiden Kernen werden, daß hier also somatische Reduktion stattfindet. Da die ersten Mitosen denjenigen des vorhergehenden Stadiums gleichen, kann man annehmen, daß sie noch tetraploide Äquationsteilungen sind. Die folgenden jedoch, in denen ebenfalls in Pro- und Metaphase noch die tetraploide Chromosomenzahl auftritt, müßten dann Reduktionsteilungen sein. Die abweichende

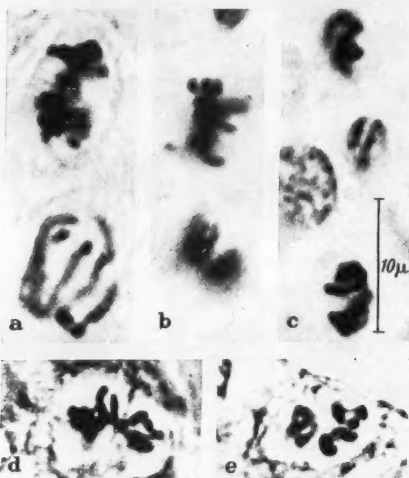


Abb. 15a—e. Mitosen während und am Ende der 4. Mitosenperiode; a, b Zweiergruppe; c Viererguppe; d, e diploide Mitosen

Anordnung der Chromosomen in der Metaphase späterer tetraploider Kernteilungen bestätigt diese Annahme. Die in der Spindellängsachse übereinanderliegenden 4 Chromosomen weichen in der Anaphase vermutlich paarweise auseinander. Diese Vereinigung der homologen Elemente und die Bündelung der Chromosomenfasern, sowie die Anordnung der Chromosomen in der späteren Anaphase (Abb. 14g), spricht für diese Auffassung. Da zum Schluß ausschließlich und in großer Zahl diploide Mitosen zu finden sind, ist ferner

anzunehmen, daß sich an die Reduktion wiederum eine, nunmehr diploide, Äquationsteilung anschließt.

Die tetraploiden Zellkerne, die zu Anfang des 4. Larvenstadiums vorwiegend das Epithel der untersuchten Epidermisabschnitte des Abdomens zusammensetzen, sind nach der Mitosenperiode nicht mehr vorhanden. Wäre keine somatische Reduktion erfolgt, müßten sie zugrunde gegangen sein. Ein derartiger Zellabbau wäre aber an dem Auftreten von pyknotischen Kernresten mit Sicherheit zu erkennen. Tatsächlich findet man schon während der 4. Mitosenperiode in der Epidermis *Pyknosen* (Abb. 16). Sie sind jedoch nicht häufig und beschränken sich auf bestimmte, nicht sehr umfangreiche Epidermisabschnitte. Möglicherweise handelt es sich um die Reste abgebauter trichogener Zellen. Die großen Borsten mit ihren polyploiden Bildungskernen werden nicht in die Puppe übernommen. Die Puppe trägt nur wenige kleine Haare. Die polyploiden Kerne der epidermalen Muskelaansatzstellen dagegen bleiben noch bis in die Puppe erhalten.

g) Das Puppenstadium

Auch die Masse der Zellkerne der Puppenepidermis ist diploid (Abb. 17a). Die Kerngrößenkurve (Abb. 10) verschiebt sich hier noch

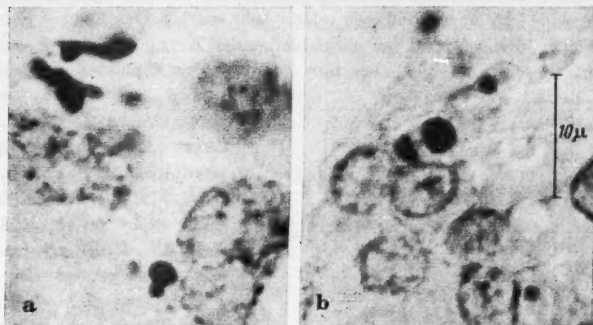


Abb. 16a u. b. Pyknoten in der Epidermis: a während der 4. Mitosenperiode; b am Ende des 4. Larvenstadiums

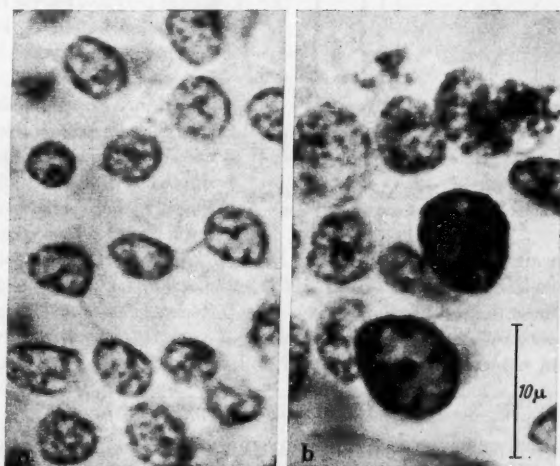


Abb. 17a u. b. a Zellkerne kurz nach der Verpuppung (Tangentialschnitte); b stark chromatische Zellkerne

weiter nach links, was wohl damit zusammenhängt, daß die Kerne sich abkugeln, also bei gleichbleibendem Volumen einen kleineren Durchmesser bekommen (s. S. 193). Diese Veränderung der Kerngestalt geht Hand in Hand mit einer Verdickung der Epidermis. Dabei findet keine

Kernvermehrung mehr statt und kein Kernwachstum; jedenfalls bei der Mehrzahl der Kerne. Ein Vergleich der Larven und Puppen zeigt, daß das pupale Abdomen kleiner ist als dasjenige der Larven (Abb. 18). (Die Larve Abb. 18b ist allerdings besonders groß, der Unterschied zwischen Abb. 18b und d dadurch relativ sehr stark.) Das Epithel kontrahiert sich, d.h. es wird bei gleichbleibender Kerngröße und Kernzahl höher. Vereinzelt liegen aber nun zwischen den diploiden Epidermis-

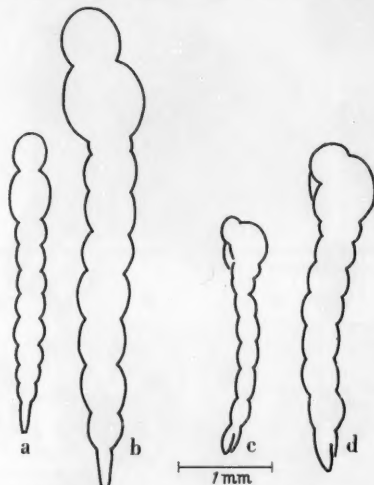


Abb. 18a—d. a, b große und kleine Larven (4. Stadium); c, d große und kleine Puppen

kernen auffallend stark chromatische Zellkerne, die ihrer Größe nach wieder tetraploid sein könnten (Abb. 17b). Da sie sich jedoch nicht teilen, und da sich die Ruhekernstruktur mit derjenigen larvaler Epidermiskerne nicht deckt, ist diese Frage nicht eindeutig zu beantworten. Es erscheint möglich, daß es sich um erneut polyploidisierte Kerne von Zellen handelt, die sich in ihrer histologischen Differenzierung befinden. Auch in der Puppenepidermis treten nach einigen Stunden wieder Mitosen auf. Sie sind durchweg diploid. Viele von ihnen stehen schräg innerhalb des Gewebes. In Ana-

logie zu den Verhältnissen bei der Differenzierung der Schmetterlingsschuppen (HENKE und POHLEY 1952) ist anzunehmen, daß es sich hier um differentielle Mitosen handelt. Die Differenzierung der Haare und Schuppen, welche die imaginale Epidermis von *Aedes aegypti* bedecken, ist nicht mit einer wesentlichen Vergrößerung der Zellkerne verbunden.

### 3. Somatische Polyploidie und Größenmodifikation

In Massenzuchten von *Aedes aegypti* wurde eine starke Variation der Körpergröße beobachtet. Es treten Puppen sehr verschiedener Länge auf (Abb. 18c, d). Die nähere Untersuchung zeigte, daß man derartige Größenunterschiede erzielen kann, wenn man das Futter verschieden dosiert. Gut gefütterte Larven wachsen nicht nur schneller und verpuppen sich früher, sie werden auch außerordentlich viel größer, als Larven, die bei einem Minimum von Futter leben (Abb. 18a, b). Wäh-

rend die Mitosenperiode des 4. Larvenstadiums normalerweise schon 3 Std nach der 3. Häutung beginnt, setzt sie bei schlecht gefütterten „Zwerglarven“ unter Umständen erst nach 3 Tagen ein. Die Variation der Körpergröße und der Entwicklungsgeschwindigkeit ist kontinuierlich.

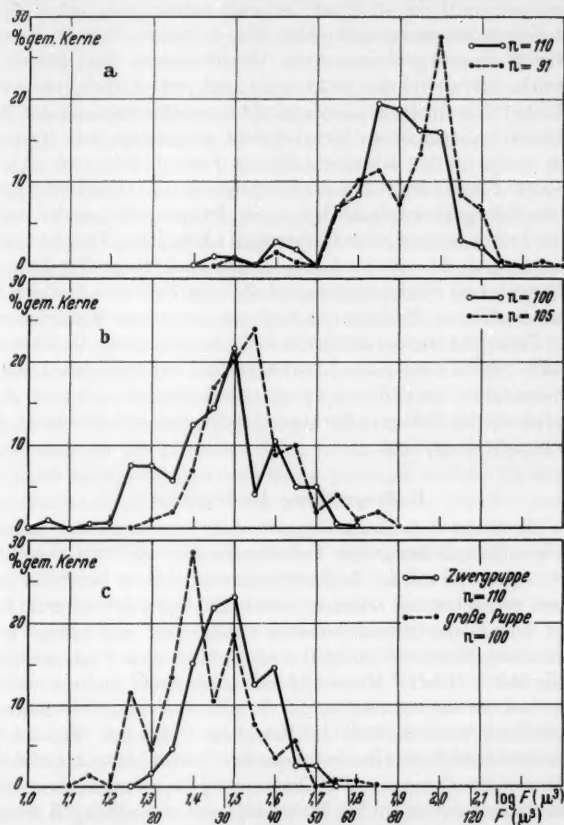


Abb. 19a—c. Kerngrößen: a von zwei großen Larven (Anfang 4. Larvenstadium); b von zwei Zwerglarven (Anfang 4. Larvenstadium); c von je einer großen und einer kleinen Puppe (kurz nach der Verpuppung)

Es interessiert nun, ob die Zellkerne der Epidermis bei den Zwerglarven sich hinsichtlich ihres Wachstums gleich verhalten, wie diejenigen der großen Larven, ob also nur die Zellvermehrung herabgesetzt ist, die Tetraploidisierung aber erfolgt, oder ob bei den Zwerglarven das

Kernwachstum im 3. und 4. Stadium ausfällt. Zur Klärung dieser Frage wurden gut und schlecht gefütterte Larven, die sich in ihrer Körpergröße erheblich unterschieden, zu Beginn des 4. Larvenstadiums fixiert und cytologisch untersucht, desgleichen frisch verpuppte große und kleine Puppen.

Die Kerngrößenmessungen (Abb. 19a, b) zeigen, daß die Kerne der *Zwerglarven* diploid geblieben sind. Das Maximum liegt jedoch nicht im Bereich „larval-diploid“, sondern ist noch weiter nach links verschoben. Es hat den Anschein als ob mindestens teilweise auch der Wachstumsschritt embryonal- zu larval-diploid ausgefallen sei. Tetraploide Mitosen traten in den besonders kleinen Larven nicht auf. (Die Zahl tetraploider Kerne nimmt mit der Körpergröße zu.) Vergleicht man dagegen die Kerngrößen verschieden großer *Puppen* miteinander, so findet man hier keinen wesentlichen Unterschied (Abb. 19c). Dies ist verständlich, da ja durch die somatische Reduktion auch die großen Larven vor ihrer Verpuppung wieder vorwiegend diploide Zellkerne besitzen.

*Das verschiedene Wachstum ist demnach mit einem verschiedenen Ausmaß der Tetraploidisierung der Epidermiskerne verbunden.* Darüber hinaus erscheint auch ein Ausfall des Kernwachstums zwischen dem 1. und dem 2. Larvenstadium im Falle der Zwergpuppen möglich. Ob auch die Vermehrungsrate der Zellkerne herabgesetzt ist, ließ sich bei dieser Untersuchung nicht feststellen.

#### D. Besprechung der Ergebnisse

Die Epidermis von *Aedes aegypti* wächst im Laufe der Larvenentwicklung nicht nur durch eine Vermehrung ihrer Zellkerne, sondern zusätzlich durch ein starkes Zellkernwachstum. Diese Vergrößerung der Zellkerne geht über das normale periodische Teilungswachstum hinaus, welches jeweils die Mitosenperioden vorbereitet, und erfolgt in zwei verschiedenen Schritten, einem bei gleichbleibender Chromosomenzahl zwischen der 1. und 2. Mitosenperiode und einem zweiten endomitotischen, der jeweils zu Beginn des 3. und des 4. Larvenstadiums die Tetraploidisierung eines Teils der Kerne zur Folge hat. TRAGER (1937) befaßte sich ebenfalls mit den cytologischen Vorgängen während des post-embryonalen Wachstums von *Aedes aegypti*. Dabei interessierte ihn das Schicksal der Gewebe in der Metamorphose, vor allem die Frage, ob Gewebe, die ausschließlich durch Zellwachstum heranwachsen, in die Imago übernommen werden oder nicht. Auch er stellte fest, daß das Wachstum der Epidermis sowohl auf Zellkernvermehrung als auch auf Zellkernwachstum beruht. Er verfolgte die Änderung der Zellkerngrößen, ohne jedoch die Frage einer Polyploidisierung anzuschneiden.

Ein *Verdoppelung der Kernvolumina zwischen dem 1. und 2. Larvenstadium* konnte auch bei dem Schmetterling *Ptychopoda seriala* (RISLER



1950) nachgewiesen werden. Auch bei *Apis mellifica* findet in der gleichen Entwicklungsphase ein solches Wachstum statt (RISLER 1954). In beiden Fällen machen die Kerne der Imaginalanlagen dieses Wachstum nicht mit. Die Ausgangsgröße der Kerne ist bei *Apis mellifica* gleich derjenigen der embryonalen Gewebe. Im Falle der Honigbiene war die Auffassung vertreten worden, daß dieser Wachstumsschritt, bei dem die Chromosomenzahl diploid bleibt, mit einem Wachstum der Chromosomen verbunden sei. Ein eindeutiger Nachweis hierfür war aber bei den damals angewandten Methoden infolge der Kleinheit der Chromosomen nicht möglich. Zu gleicher Zeit hatten jedoch MERRIAM und RIS (1954) — auch sie mit dem Ziel, die Unterschiede in der Zellwertigkeit (haploid oder diploid) zwischen den weiblichen und den männlichen Tieren festzustellen — eine Untersuchung an *Apis mellifica* abgeschlossen. Ihre Schlüsse stützen sich auf die Ergebnisse einer Kombination von Kerngrößenmessungen mit spektrophotometrischen Bestimmungen des DNS-Gehalts der Kerne. Im Hinterdarm der Königinnen und Arbeiterinnen fanden sie neben den normalen diploiden Epithelkernen einen kleineren Kerntyp, der nur die Hälfte der DNS-Menge enthielt. Da sie nicht die Chromosomenzahlen untersuchten, kamen sie zu dem Schluß, es müßten auch bei weiblichen Tieren haploide Zellen vorkommen. Der Vergleich mit den eigenen Ergebnissen (RISLER 1954) läßt jedoch annehmen, daß sie die im Hinterdarm neben den larval-diploiden vorkommenden embryonal-diploiden Kerne gemessen hatten. Diese würden sich demnach tatsächlich nicht nur durch ihre Größe, sondern auch durch die Menge ihrer DNS unterscheiden. Wenn diese Annahme richtig ist, dann beruht der Unterschied zwischen embryonal-diploid und larval-diploid nicht auf einer Kernvergrößerung durch Vermehrung des Kernsafts (GETTLER 1941), sondern stellt ein *echtes Kernwachstum* dar.

Das regelmäßige Auftreten tetraploider Mitosen als Folge eines 2. Kernwachstums, das nunmehr mit einer Endomitose verbunden ist, geht mit einem starken Wachstums des Abdomens Hand in Hand. TRAGER hatte neben seinen oben erwähnten Kernmessungen unter anderem auch das Wachstum der Kopfkapsel und des Gesamtkörpers gemessen. Aus seinen Kurven geht einmal hervor, daß die Kopfkapsel schrittweise im Rhythmus der Häutungen größer wird. Dies ist auf Grund der Sklerotisation der Kopfkapsel zu erwarten. Zum andern aber zeigen die Messungen der Gesamtlänge, daß in diesem Fall die Vergrößerung nahezu kontinuierlich vor sich geht. Die Cuticula des Abdomens ist sehr dünn und dehnungsfähig. Diese Tatsache läßt ein Wachstum auch zwischen den Häutungen zu. Gerade in der Zeit vom Ende des 2. bis zum Beginn des 4. Larvenstadiums, also zur Zeit der Tetraploidisierung, ist TRAGERS Kerngrößenkurve besonders steil. Im letzten Stadium wird sie dann schnell flach. Die Mitosenperiode dieses Stadiums ist also trotz der so

starken Zellvermehrung nicht mehr mit einem Körperwachstum verbunden. Sie bereitet auch kein solches vor.

Auch die Epidermiskerne anderer Insekten werden am Ende der Larvenentwicklung teilweise polyploid (*Ptychopoda seriata*: RISLER, *Apis mellifica*: RISLER, Tenthrediniden: SANDERSON 1933). Bei *Apis mellifica* sind dabei scharf begrenzte, bestimmte Teile der Epidermis schon im 3. Larvenstadium tetraploid (Muskelsatzstellen und Stigmenmund), während eine allgemeine Polyploidisierung ganzer Körperregionen erst im letzten Larvenstadium erfolgt, ganz in gleicher Weise, wie dies bei *Ptychopoda* und *Aedes* der Fall ist. Bei *Aedes* wachsen jedoch, anders als bei *Apis*, die Muskelsatzstellen rein endomitotisch. WAGNER (1951) beschrieb das rein endomitotische Wachstum der Larvenepidermis von *Calliphora erythrocephala*. Dieselben Gewebe können sich bei verschiedenen Insektengruppen hinsichtlich ihres Gewebewachstums während der Larvenentwicklung verschieden verhalten. Daß FROLOWA (1929) auf ihrer Suche nach polyploiden Mitosen in verschiedenen Geweben der Culiciden *Chaoborus* (*Corethra*) in deren Epidermis keine Tetraploidie feststellte, hängt sicher damit zusammen, daß sie ausschließlich junge Puppen untersuchte, deren Zellkerne nach der auch hier zu vermutenden somatischen Reduktion wieder diploid sind. Interessanterweise beschrieb sie aber in Imaginalanlagen von Mycetophiliden-Puppen tetraploide Mitosen. Betrachtet man ihre Abbildung, so erscheint es nicht ausgeschlossen, daß es sich hierbei nicht um Imaginalanlagen, sondern um larvale Epidermis handelt, die unter starker Zellkernvermehrung im Umbau begriffen ist. Dieser Fall bedarf einer Nachuntersuchung.

Die somatische Reduktion beginnt in der Epidermis ein Stadium früher als im Darmtrakt. Ihr Kennzeichen ist die Folge mehrerer Mitosen und die daraus resultierende starke Vermehrung und Größenabnahme der Zellkerne ohne nachfolgendes erneutes Wachstum des Tieres<sup>1</sup>. Auch im Hinterdarm der Culiciden ist die somatische Reduktion die Folge einer Reihe unmittelbar aufeinanderfolgenden Kernteilungen ohne Zwischenwachstum (BERGER 1938a). In beiden Fällen wird mit dieser Teilungsfolge der Aufbau des imaginalen Gewebes aus dem larvalen eingeleitet. Zellteilungsfolgen ähnlicher Art waren in der Epidermis der Honigbiene kurz vor ihrer Verpuppung aufgefallen. Die Gruppierung der Teilungsfiguren zeigte dort ebenfalls eine unmittelbare Folge von Mitosen an, und die Epidermisabschnitte, die zuvor polyploide Zellkerne beherbergten, hatten später Kerne geringerer Wertigkeit (RISLER). Die cytologischen Vorgänge sind dort jedoch noch nicht eingehend genug untersucht. Polyploide Mitosen in der Puppenepidermis von *Ptychopoda*

<sup>1</sup> Die Tatsache der Kernverkleinerung geht auch aus TRAGERS (1937) Kernmessungen hervor. Allerdings beginnt sie dort schon im 3. Larvenstadium. Wie er zu dieser Feststellung kommt, ist noch unklar.

*seriata* (RISLER) — zum entsprechenden Entwicklungszeitpunkt unmittelbar vor der Verpuppung — mögen eine ähnliche Rolle spielen wie bei *Aedes*. Damals war allerdings vermutet worden, daß die polyploiden Mitosen mit der Schuppendifferenzierung zusammenhängen. Auch in diesem Fall soll eine Nachuntersuchung eine Klärung herbeiführen; sie ist ebenfalls beim Fettkörper von *Ptychopoda* notwendig, dessen Zellkerne bei jeder Mitosenperiode unmittelbar nacheinander 2 Teilungsschritte durchmachen, die ebenfalls mit einer zweimaligen Größenabnahme einhergehen. Ob die von BUSHNELL (1937) im Mitteldarm von Käfern vermutete somatische Reduktion tatsächlich ein Fall solcher Kernverkleinerung ist, oder ob nicht vielmehr an die Stelle der großen Epithelkerne von den Regenerationsnestern her neu polyploidisierte Kerne nachrücken, bedarf ebenfalls einer Nachuntersuchung.

Teilungsfolgen, die mit einer Größenabnahme der Kerne verbunden sind, wurden in der Embryonalentwicklung von Wirbeltieren (multiple Sukzedanteilung, G. HERTWIG 1939) gefunden. Auch bei der Honigbiene (RISLER) folgen einander in der frühen Eientwicklung drei solche Mitosenreihen. In diesen beiden Fällen bleibt jedoch die Chromosomenzahl gleich. Dagegen beschrieben TUZET und MANIER (1956) Reduktionsmitosen oktoploider Spermatogonien bei verschiedenen Collembolen, welche dort der eigentlichen Meiose vorausgehen. Dieser Befund ist nicht unwidersprochen geblieben (SAURE und BRUMMER-KORVENKONTIO 1958), jedoch ist offenbar in der Spermatogenese von *Lepisma saccharina* (FEUCHT 1959) eine Spermatogonienreduktion von tetraploid zu diploid die Regel. Grundsätzlich erscheint eine solche Reduktion polyploider Zellkerne in einer Sukzedanteilung durchaus möglich.

Der Verlauf der somatischen Reduktion selbst kann bei Berücksichtigung der zeitlichen Folge bestimmter Chromosomenkonfigurationen in folgender Weise gedeutet werden (Abb. 20): Einer tetraploiden Äquationsteilung folgt die Reduktionsteilung, bei der in der Metaphase die 4 Chromosomen jedes Homologenbündels nicht nebeneinander in einer Ebene liegen, sondern übereinander in der Längsrichtung der Spindel. Dann werden vermutlich in der Anaphase jederseits 3 Chromosomenpaare auseinanderweichen und so zwei diploide Tochterkerne bilden. Diese teilen sich später noch einmal mit der diploiden Chromosomenzahl. Vergleicht man die Chromosomenbilder der epidermalen Reduktionsmitosen mit denjenigen des Ileums (BERGER 1938a, b, M. GRELL 1946), so ähneln einander eigentlich nur der erste Schritt beim Hinterdarm und der Reduktionsschritt in der Epidermis, und zwar insofern, als die Homologenbündel zu diesem Zeitpunkt in der Gegend ihrer Spindelansatzstellen besonders eng zusammengefaßt sind. Weitere Parallelen lassen sich bis jetzt noch nicht ziehen. Im Hinterdarm zeichnen sich spätere Prophasen durch eine sehr variable Homologenbündelung aus

(M. GRELL), und in den Äquatorialplatten liegen die Chromosomen dann teilweise sehr schön nebeneinander in einer Ebene.

Die cytologische Untersuchung der Größenvarianten bringt eine weitere Bestätigung für die Auffassung, daß bei gleichbleibender Häutungszeit,

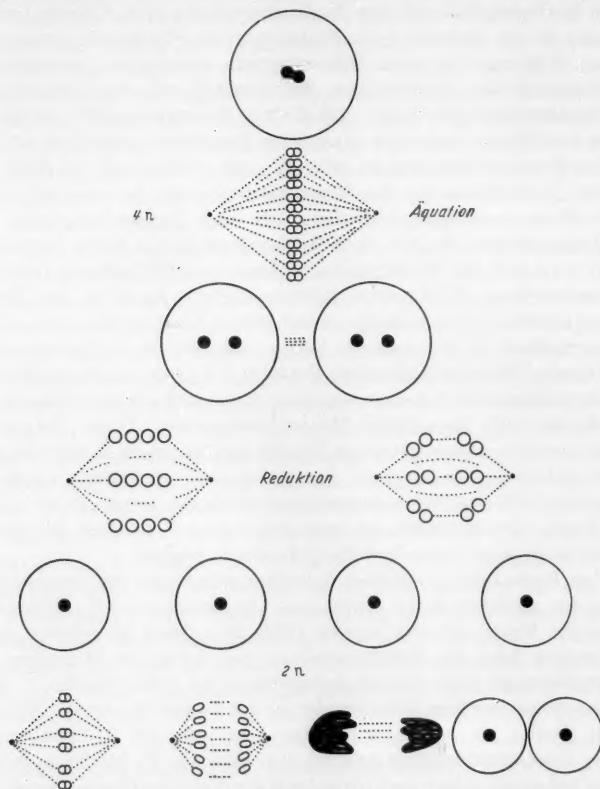


Abb. 20. Schema der somatischen Reduktion in der Epidermis von *Aedes aegypti* (4. Mitosenperiode)

welche die Vermehrungsrate der Zellkerne in der Epidermis und damit das Wachstum der Larven bis zu einem gewissen Grad bestimmt, auf dem Wege der endomitotischen Polyploidisierung ein verstärktes Wachstum ermöglicht wird. Dieses zusätzliche Wachstum kann entweder, genetisch bestimmt, bei der Differenzierung etwa der Größe der verschiedenen Geschlechter eine Rolle spielen, oder aber modifikatorisch hervorgerufen sein. Eine derartige Modifikation ist sicherlich das ver-

stärkte Wachstum der Bienenkönigin gegenüber dem der Arbeiterinnen. Es geht mit einer unterschiedlichen Polyploidisierung der Epidermiszellen Hand in Hand (SANDERSON and HALL 1948, RISLER), eine Feststellung, die jedoch weiterer Untersuchung bedarf. Es erscheint möglich, daß das gelegentliche Auftreten von Zwergpuppen bei Bienen, wie auch die sehr häufige, starke Modifikabilität der Körpergröße bei anderen Insekten mit einem verschieden starken Kernwachstum in der Epidermis und in anderen Geweben zusammenhängt.

### Zusammenfassung

1. Während der Larvenentwicklung von *Aedes aegypti* wachsen die Zellkerne bei gleichbleibender diploider Chromosomenzahl zwischen den Mitosenperioden des 1. und 2. Larvenstadiums über das normale Teilungswachstum hinaus auf etwa das Doppelte ihres Volumens heran (embryonal-diploid, larval-diploid). In den Imaginalanlagen, deren Zellen sich auch außerhalb der Mitosenperioden teilen, machen die Zellkerne dieses Wachstum nicht mit.

2. Tetraploide Mitosen zeigen in der Mitosenperiode des 3. Larvenstadiums, daß in der Epidermis der Abdominalsegmente ein Teil der Zellen tetraploid geworden ist. Die Zellkerne machen dementsprechend einen 2. Wachstumsschritt durch, der mit einer Endomitose verbunden ist.

3. Die Zahl tetraploider Epidermiskerne nimmt zu Anfang des 4. Larvenstadiums noch weiter zu. In der sehr langen 4. Mitosenperiode, welche der Verpuppung vorausgeht, teilen sich die zuvor tetraploiden Zellkerne mehrmals hintereinander. Sie werden dabei wieder diploid, erfahren also eine somatische Reduktion. Diese starke Zellvermehrung erfolgt ohne weiteres Körperwachstum. Unterschiede im Chromosomenverhalten während der Teilungsfolge führen zu der Annahme, daß der zweite von 3 Teilungsschritten eine Reduktionsteilung ist. Hierbei ordnen sich die Metaphasechromosomen nicht wie in den Äquationsteilungen in eine Ebene ein, sondern liegen übereinander in der Längsrichtung der Spindelachse.

4. Die Tetraploidisierung der Epidermiskerne fällt aus, wenn die Larven infolge knapper Fütterung eine nur geringe Körpergröße erreichen. Der hieraus resultierende Kerngrößenunterschied zwischen großen und kleinen Larven gleichen Entwicklungsalters fällt bei den Puppen fort, deren Kerne infolge der somatischen Reduktion auch bei großen Tieren diploid sind.

### Literatur

- BAUDISCH, K.: Cytologische Beobachtungen an den Myzetozyten von *Periplaneta americana* L. Naturwiss. 43, 358 (1956).  
BERGER, CH. A.: Multiplication and reduction of somatic chromosome groups as a regular developmental process in the mosquito, *Culex pipiens*. Carnegie Inst. Wash. Publ. 496, 209—232 (1938a). — Prophase chromosome behavior

- in the division of cells with multiple chromosome complexes. *J. Hered.* **29**, 351—357 (1938b).
- BIER, K.: Endomitose und Polytanie in den Nährzellen von *Calliphora erythrocephala* MEIGEN. *Chromosoma* (Berl.) **8**, 493—522 (1957).
- BUCHNER, P.: Endosymbiosiestudien an Schildläusen. III. *Macrocerooccus* und *Puto*, zwei primitive Pseudococcinen. *Z. Morph. u. Ökol. Tiere* **43**, 523—577 (1955).
- BUSHNELL, R. J.: The development and metamorphosis of the mid-intestinal epithelium of *Acanthoscelides obtectus* (SAY) (Coleoptera). *J. Morph.* **60**, 221—236 (1937).
- EILERS, W.: Somatische Kernteilung bei Coleopteren. *Z. Zellforsch.* **2**, 593—650 (1926).
- FEUCHT, E.: Untersuchungen zur Cytologie des Wachstums in der postembryonalen Entwicklung von *Lepisma saccharina* L. *Zool. Jb., Abt. Anat. u. Ontog.* 1959 (im Druck).
- FROLOWA, S.: Normale und polyploide Chromosomengarnituren bei einigen *Drosophila*-Arten. *Z. Zellforsch.* **3**, 682—694 (1926). — Die Polyploidie einiger Gewebe bei Dipteren. *Z. Zellforsch.* **8**, 542—565 (1929).
- GETTLER, L.: Die Analyse des Kernbaus und der Kernteilung der Wasserläufer *Gerris lateralis* und *Gerris lacustris* und die Somadifferenzierung. *Z. Zellforsch.* **26**, 641—672 (1937). — Die Entstehung der polyploiden somatischen Zellkerne bei Heteropteren durch wiederholte Chromosomenteilung ohne Spindelbildung und Kernteilung. *Naturwiss.* **26**, 722—723 (1938). — Die Entstehung der polyploiden Somakerne der Heteropteren durch Chromosomenteilung ohne Kernteilung. *Chromosoma* (Berl.) **1**, 1—22 (1939). — Neue Untersuchungen über Bau und Wachstum des Zellkerns in Geweben. *Naturwiss.* **28**, 241—248 (1940). — Das Wachstum des Zellkerns in tierischen und pflanzlichen Geweben. *Ergebn. Biol.* **18**, 1—54 (1941). — Endomitose und endomitotische Polyploidisierung. *Protoplasmatologia, VIc.* Wien: Springer 1953.
- GRELL, SISTER MARY: Cytological studies on *Culex*. I. Somatic reduction divisions. *Genetics* **31**, 60—76 (1946).
- HENKE, K., u. H. POHLEY: Differentielle Zellteilungen und Polyploidie bei der Schuppenbildung von *Ephesia kühniella*. *Z. Naturforsch.* **7b**, 65—79 (1952).
- HERTWIG, G.: Der Furchungsprozeß des Mäuseeies, ein Beispiel für wiederholte Volumenhalbierung polymerer Kerne und Chromosomen durch Sukzedanteilung. *Z. mikr.-anat. Forsch.* **45**, 37—45 (1939).
- HINTZSCHE, E.: Statistische Probleme aus der Kerngrößenforschung. *Experientia* (Basel) **1**, 103—110 (1945).
- HOLT, C. M.: Multiple complexes in the salivary tract of *Culex pipiens*. *J. Morph.* **29**, 607—627 (1917).
- HUGHES-SCHRADER, S.: Cytology of several Iceryne coccids, with special reference to parthenogenesis and haploidy. *J. Morph.* **50**, 475—495 (1930).
- KÜHN, A., u. H. PIEPHO: Die Reaktion der Hypodermis und der Versonschen Drüsen auf das Verpuppungshormon bei *Ephesia kühniella*. *Biol. Zbl.* **58**, 12—51 (1958).
- LIPP, CH.: Über Kernwachstum, Endomitosen und Funktionszyklen in den trichogenen Zellen von *Corixa punctata*. *Chromosoma* (Berl.) **5**, 454—486 (1953). — Beitrag zur somatischen Cytologie der Schmetterlinge. *Chromosoma* (Berl.) **7**, 1—13 (1955).
- MERRIAM, R. W., and H. RIS: Size and DNA content of nuclei in various tissues of male, female and worker honeybees. *Chromosoma* (Berl.) **6**, 522—538 (1954).
- METZ, C. W.: Chromosome studies on the *Diptera*. II. The paired association of chromosomes in the *Diptera* and its significance. *J. exp. Zool.* **21**, 213—279

- (1916). — Association of homologous chromosomes in tetraploid cells of *Diptera*. Biol. Bull. **43**, 369—373 (1922).
- MEVES, F.: Die Spermatozytenteilung bei der Honigbiene (*Apis mellifica* O.). Arch. mikr. Anat. **70**, 414—491 (1907).
- O'BRIEN, R.: Desoxyribose nucleic acid in a haploid-diploid species (*Steatococcus tuberculatus* MORRISON). Chromosoma (Berl.) **8**, 229—259 (1956).
- OXSALA, T.: Über Tetraploidie der Binde- und Fettgewebe bei den Odonaten. Hereditas (Lund) **25**, 132—144 (1939).
- PAINTER, T. S., and E. C. REINDORF: Endomitosis in the nurse cells of the ovary of *Drosophila melanogaster*. Chromosoma (Berl.) **1**, 276—283 (1939).
- POLLISTER, A. W., and H. RIS: Nucleoprotein determination in cytological preparations. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. **12**, 147—157 (1947).
- RISLER, H.: Kernvolumenänderungen in der Larvenentwicklung von *Ptychopoda seriata* Schrk. Biol. Zbl. **69**, 11—28 (1950). — Die somatische Polyploidie in der Entwicklung der Honigbiene (*Apis mellifica* L.) und die Wiederherstellung der Diploidie bei den Drohnen. Z. Zellforsch. **41**, 1—78 (1954).
- SANDERSON, A. R.: The cytology of parthenogenesis in *Tenthredinidae*. St. Andrews Univ. Publ. **33**, 321—451 (1933).
- , and D. W. HALL: The cytology of the honeybee (*Apis mellifica* L.). Nature (Lond.) **162**, 34—35 (1948).
- SAURE, L., u. M. BRUMMER-KORVENKONTIO: Über die Meiose und die Chromosomenzahlen einiger Collembolen. IV. Biologica **39**, 1—14 (1958).
- TRAGER, W.: Cell size in the relation to the growth and metamorphosis of the mosquito, *Aedes aegypti*. J. exp. Zool. **76**, 467—489 (1937).
- TUZET, O., et J.-F. MANIER: Contribution à l'étude de la spermatogenèse des Aptérygotes: *Orchesella villosa* L., *Entomobrya* du groupe *nivalis* L., *Entomobrya nigrocincta* DENIS, *Sminthurus viridis* (L.) LUBB, (Collemboles) et *Campodea monspessulana* CONDÉ (1953) (Diploure). Ann. Sci. natur. Zool., Sér. XI **18**, 15—32 (1956).
- WAGNER, G.: Das Wachstum der Epidermiskerne während der Larvenentwicklung von *Calliphora erythrocephala* MEIGEN. Z. Naturforsch. **6b**, 86—90 (1951).

Doz. Dr. H. RISLER, Zoologisches Institut der Universität Tübingen,  
Hölderlinstraße 12



CELL FUNCTION IN THE OVARY OF DROSOPHILA  
I. DNA CLASSES IN NURSE CELL NUCLEI AS DETERMINED  
BY AUTORADIOGRAPHY

By

J. JACOB and J. L. SIRLIN\*

With 9 Figures in the Text

(Eingegangen am 1. Dezember 1958)

Nurse cells are favourable material for cytochemical work because of their intense activity and the possibility of sampling different stages of increasing function in a single ovariole. A study of nuclear composition in such an instance may reveal differences between nuclei, an aspect which is related to the general problem of nuclear differentiation during development. The richness of nuclear and cytoplasmic RNA in these cells, especially conspicuous during their late differentiation, is quite compatible with the size of the obvious product of their function, viz. the deposition of reserves and of ooplasm in the growing oocyte. Further, the nuclear dimensions of these cells make them suitable objects for autoradiography.

Early in the course of work on nurse nuclei it was clear to us that there occurred sizeable increases in the amount of DNA in growing ovarian chambers, and it became apparent that an unequivocal quantitation of relative DNA contents would be desirable as landmarks of differentiation of these nuclei. The functional significance of increasing amounts of DNA is fairly obvious in these nuclei. With increasing ploidy the bundles of chromonemata tend to loosen, remaining unloosened only at few points (BIER 1957). Very large masses of RNA are interspersed amidst the chromonemata which show knob-like thickenings particularly abundant at the interface of contact with the RNA masses and the nuclear membrane (SIRLIN and JACOB, in press)<sup>1</sup>. It is clear then that enlargement of this machinery as a whole should permit a greater output of metabolites. If on the other hand, DNA or its components are transferred to the oocyte, then greater amounts of DNA *per se* are of importance.

Several authors have already dealt with the question of increasing DNA in the nurse nuclei, either with qualitative (HERTWIG 1935, PAINTER

\* Research worker of the British Empire Cancer Campaign.

<sup>1</sup> Note added in proofs. — Since this paper went to press, photographs of these condensations of chromatin have been published by BRUN, J., and D. CHEVASSU, *Chromosoma* 9, 536–558 (1958) (cf. their Fig. 11). Our own observations were on Carnoy-fixed sections stained with Feulgen-fast green.

and REINDORP 1939, HSU and HANSEN 1953) or with quantitative techniques (FREED and SCHULTZ 1956, SCHULTZ 1956), but with no accurate description of the various possible nuclei studied. This is relevant because nurse nuclei differ not only between chambers at different stages but also within chambers at later stages (KING, RUBINSON and SMITH 1956). In the present work the DNA classes of the nurse nuclei are studied stage by stage by measurement with high-resolution autoradiography of the adenine- $^{14}\text{C}$  incorporated into the nuclei acid.

### Experimental

Approximately 0.1 mg (5  $\mu\text{c}$ ) of adenine-8- $^{14}\text{C}$  sulphate hemihydrate was freshly dissolved in 0.5 cc distilled water and thoroughly mixed with 5 cc dead-yeast *Drosophila* food (basic medium of ALDERSON 1957) under semi-sterile conditions. Four pairs of flies (*D. melanogaster*, Oregon-K inbred strain) just eclosed in similar food (to avoid contamination with live yeast) without adenine, were immediately seeded on the radioactive food for three days at 25° C.

Female flies emerging from 10.5 to 11 days after the onset of egg laying (about one and a half days after seeding) were maintained in the same radioactive food for a further 36 to 48 hours at 25° C. The flies were then etherized and their ovaries dissected out in *Drosophila* Ringer and fixed for thirty minutes in alcohol-acetic acid (3:1). During a subsequent stay of thirty minutes in 95 per cent alcohol the ovarioles were separated from each other and those from the various flies were pooled. They were then lightly stained in alcoholic eosin (to facilitate orientation during embedding), cleared in terpineol for two hours, and embedded after thirty to forty minutes in paraffin wax at no more than 58° C. The whole procedure was accomplished within four hours from the beginning of fixation. The fixative used retains all polymerized nucleic acids and largely extracts low molecular weight nucleotide derivatives (MERRIAN 1958). The precautions adopted avoid interference with subsequent enzymatic hydrolysis and any depolymerization of DNA by heat. Longitudinal sections were cut at 5  $\mu$  thickness and about three ovarioles were mounted per gelatinized slide. After dewaxing and hydration practically no eosin remained in the tissue.

The slides were then treated with enzymes as follows. All were treated with (a) 0.05 per cent ribonuclease (Light's protease free) in veronal buffer at pH 6.12, for two hours at 37° C. Some of these, following a rinse in distilled water, were treated with (b) 0.01 per cent crystalline deoxyribonuclease (Light's) in veronal buffer at pH 9.64, with 0.005 M  $\text{MgSO}_4$  and 0.05 M  $\text{NH}_4\text{OH} \cdot \text{HCl}$  (the pH drops to 6.7–6.8 after adding the latter), for two hours at 37° C. The enzymes were dissolved fifteen minutes before each hydrolysis began. After enzyme treatment the slides were rinsed in distilled water and hydrolysed with 5 per cent trichloroacetic acid for five minutes at 2–4° C, to remove soluble nucleotides. Whenever necessary the slides were stored for short periods in 70 per cent alcohol at about 4° C.

After prolonged rinse in distilled water the slides were coated with Kodak AR. 10 film and exposed in the dark and cold for three or twelve days. They were then developed for five minutes in Kodak D 19b, fixed (all photographic processing at 17.5° C) and rinsed for several hours. The preparations were stained with methyl green-pyronin at pH 4.7 and some of those treated with both enzymes were stained with aqueous yellowish eosin (Gurr's). They were then quickly passed through alcohols, xylol and mounted in Xam (Gurr's, R. I. 1.526). Using the methyl green-pyronin stain, the stages studied in the preparations treated with ribonuclease did

not bind pyronin and the nuclei stained with a true blue colour, indicating that the DNA was polymerized. In the preparations treated with both enzymes these stages did not stain at all. Control material treated as for (a) but without the enzyme lose little RNA. Untreated material binds pyronin strongly in both nuclei and cytoplasm of nurse cells.

The preparations were examined at  $\times 1280$  under Zeiss (stand W) bright or phase contrast apochromatic optics and Köhler illumination. By means of an ocular grid focusable, and thus free of parallax error, the grains in the autoradio-

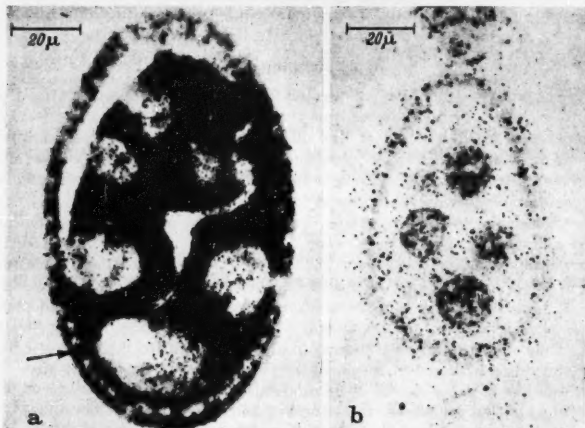


Fig. 1a and b. a A stage 7 chamber not treated with enzymes, and its autoradiograph. In the nurse cells both the nuclear and cytoplasmic RNA are heavily labelled, but the autoradiograph of the latter does not show up in the photograph due to the intense pyroninophilia. The oocyte nucleus (arrow) shows almost no autoradiograph. Exposure twelve days. Methyl green-pyronin. b A stage 6 chamber treated with ribonuclease, and its autoradiograph. Exposure, stain and photographic procedure as for a

graphic emulsion were scored under bright optics within  $1\mu$  of the edge of the mass of nuclear material stained with methyl green (DNA), and the area of the latter in the sections was measured. The nuclear volume where DNA is present was obtained by multiplying the area where DNA is present by the section thickness; this datum will be hereafter referred to briefly as "DNA volume". The DNA masses showed some internal variation of optical density, specially in later stages. When counting at the present grain densities over extensive sources as here, the partitioning of the field by the grid is indispensable.

The ovarian chambers were classified according to the stages of KING *et al.* (1956). Grains were counted over ribonuclease-treated nurse nuclei in stages 2 to 10 and follicle cell nuclei in stage 7, the contour of all of which can be reasonably well visualized with methyl green staining (Fig. 1). Grains were also counted on the ooplasm of stages 8–12. In the nurse nuclei patches of nuclear material other than DNA (presumably protein) which might have been occasionally interposed between the DNA and the nuclear membrane specially at the later stages, would therefore have not been scored or measured. Nurse nuclei in stage 1 were not scored as it is impossible in sections to single them out from germarial or follicle

nuclei. Nuclei in any one section of chambers in stages 2 to 6 commonly overlap and therefore no scoring of individual nuclei was attempted. In these stages, therefore, grain counts and measurements were carried out over all the observed DNA, and the totals divided by 16 in stage 2 (fifteen nurse nuclei plus the oocyte nucleus which cannot be distinguished in these preparations) or by 15 in stages 3 to 6 (the oocyte nucleus being avoided) to obtain an average count per nucleus. No stage 4 chamber suitable for scoring was available. From stages 7 to 10 individual nuclei were confidently scored. Nuclei in stages later than 10 appear broken up into several small masses, making it impossible to reconstruct the individual nuclei. A permanent record of the position and outline of all nuclei in the successive sections, and of their counts and areas, permitted the reconstruction of the individual nuclei in stages 7 to 10. As frequent checks on the spatial relationships between the nuclei in the sections themselves were made during reconstruction, it is believed that this was achieved without significant error. According to their positions in the chambers the nuclei were classified into three anterior, nine middle and three posterior, the posterior being closest to the oocyte; the allocation of nuclei in these groups can be admittedly arbitrary in certain instances, but it is adequate for the present purpose. In three nuclei where counts (not area) on one section out of several of these nuclei could not be scored, the missed counts were calculated from the average count per area obtained in all the other sections of the nucleus concerned. These three nuclei are marked by a dash under the abscissa in Fig. 5. The procedure for scoring follicle nuclei was the same as for nurse nuclei except that, the diameter of the follicle nuclei being  $4\mu$  (i.e. less than the section thickness), only those nuclei fully contained in one section were considered.

Some tracer was detected in the cytoplasm after treatment with ribonuclease (Fig. 1b) and also in the nuclei after treatment with both enzymes. (As a precaution this was confirmed in another batch of flies emerged from 9.5 to 10 days after laying.) Most of this tracer probably is in proteins or in prosthetic nucleotides. For the present purpose this, being small in relation to counts on DNA per unit area (Figs. 2-5), was treated as experimental error (different from background) and was measured in both the nurse nuclei and the follicle nuclei of ovarioles treated with both enzymes. The proteins remaining in the sections stained faintly with eosin and the visualization of the nuclei was sometimes aided with phase optics. For each nuclear type the procedure of scoring was the same as when DNA was unremoved. The error per  $100\mu^2$  of nucleus for three days exposure was: stage 3 zero  $\pm 0.28$  (assumed also for stage 2), stage 5  $1.80 \pm 0.42$ , stage 6  $2.78 \pm 0.55$ , stage 7  $4.05 \pm 0.33$ , stage 8  $2.93 \pm 0.39$ , stage 9  $2.39 \pm 0.26$  and stage 10  $1.85 \pm 0.22$ . The error per follicle nucleus at stage 7 was  $0.16 \pm 0.09$  for three days exposure.

The inherent background of the emulsion was measured in almost every section studied by counting on three different areas of  $290\mu^2$  each, at approximately  $60\mu$  from tissue. The counts did not differ appreciably and the averages within slides per  $100\mu^2$  were  $2.85 \pm 0.09$  and  $4.31 \pm 0.13$  for material treated with ribonuclease and exposed for three and twelve days respectively, and  $4.10 \pm 0.10$  for material treated with both enzymes and exposed twelve days. Both the counts for background and experimental error were subtracted from counts on DNA to obtain the net count. As the DNA purines in the flies have been uniformly labelled throughout larval and adult life with the adenine- $^{14}\text{C}$  in the food, it can be taken that net counts on DNA are proportional to the amounts of DNA. Non-radioactive ovarioles did not produce an autoradiograph after twelve days exposure.

Considerations on resolution indicate that allowance for a penumbra of  $1\mu$  for the autoradiographic images of all nuclei ranging from 4 to  $50\mu$  in diameter will result in a small relative underestimation for the larger nuclei. This bias will

be actually counteracted as a result of the lesser isotope content per unit volume in the larger nuclei (Figs. 2—5). On the other hand, the sampling error will be greater in the much lesser counts obtained for the smaller nuclei. The method of calculation of the DNA volume involves an error which rapidly decreases with increasing nuclear size. Most of the counts and all measurements were independently scored by both observers and generally found to agree within 10 per cent and then averaged. Very occasional departures from such agreement were redetermined till the difference could be ascribed to sampling error.

As an approximation, the counts are linearly interconvertible at the present grain densities between the two exposure times given to the preparations. For example, the net counts on DNA of all nuclei of two pairs of stage 3 and stage 7 chambers, one member of each pair exposed for three days and the other for twelve days, were 155.7:675.2 and 2,063.3:8,123.2, corresponding well with a ratio of 1:4 (the disagreement in respect of the counts for the shorter exposure is only plus 8 and minus 1.6 per cent). As the members of each pair of chambers probably came from different flies, these figures show that the combined experimental and biological variation is not great. DNA counts from preparations exposed for three days only will be presented, except for stage 10 where counts were obtained from preparations exposed for twelve days and then converted to three days exposure. The nurse nuclei scored for stages up to 7 came from a single ovariole and from different ones for the later stages. Scores on follicle nuclei were made in the same stage 7 chamber where nurse nuclei were scored.

### Results

Net counts on DNA of nurse nuclei of chambers in stages 2 to 10 are given in Figs. 2—5. As mentioned in the previous section, average counts are given for stages 2 to 6 (Fig. 2) and individual nuclear counts for stages 7 to 10 (Figs. 2—5). It can be seen that counts on the three posterior nuclei are higher than those on the remaining nuclei in stages 7—9, and about equal to some of the latter in stage 10. The average count for the three posterior nuclei has decreased by 25 per cent between stages 9 and 10. Average counts on the middle nuclei are lower than those on the posterior nuclei and higher than those on the anterior nuclei in stages 7—9. In stage 10 the counts on middle nuclei appear to correspond to two classes: the average count for (a) the lower class formed by seven nuclei, is 22 per cent lower than the average count on all middle nuclei in stage 9, and for (b) the higher class formed by two nuclei, is considerably higher than for the lower class and about 30 per cent higher than the average count on all middle nuclei in stage 9. The average counts on anterior nuclei are lower than those on the middle nuclei in stages 7—9, the difference decreasing with increasing order of stages. By stage 10 the average counts on the anterior nuclei can be almost as high as the average of the highest counts on middle nuclei. The loss of counts from stage 9 to 10 in the three posterior and in the middle nuclei of the low count class is larger than would be expected on account of the conversion for a different exposure involved in the data for stage 10 nuclei.

The counts per unit area in Figs. 2—5 give an idea of the "concentration" of DNA. These counts are substantially the same for all nuclei in any stage and have distinctly decreased by stage 10. Because the proportion

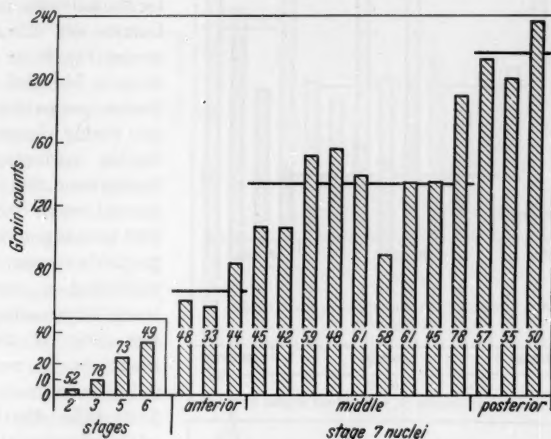


Fig. 2. Average net grain counts on nuclei of stages 2—6 and net counts on individual nuclei of stage 7. In cross section counts per unit area ( $241.7\mu^2$ )

of sections of a nucleus that are filled in their entire depth by nuclear material is less for small nuclei than for large ones, these counts should be the more underestimated the earlier the stage. The sizes of the nuclei are given in Table 1.

Table 1. Mean perpendicular diameters of nurse nuclei ( $\mu$ )

	Stage								
	1	2	3	5	6	7	8	9	10
Largest posterior nucleus	4.5	5.5	8	16	16	25	32	40	48
Smallest anterior nucleus				10	16	19	22	25	27

#### Determination of the count for the diploid amount of DNA

To analyse different levels of ploidy in the nurse nuclei it is first necessary to determine the count for a diploid nucleus. This was done by counting on follicle cell nuclei at the anterior end of a stage 7 chamber, where most of them seem to be in interphase. Further, these nuclei have not yet enlarged or changed in any way to suggest an increase of DNA above diploid level. But these nuclei should belong to 2—4n classes

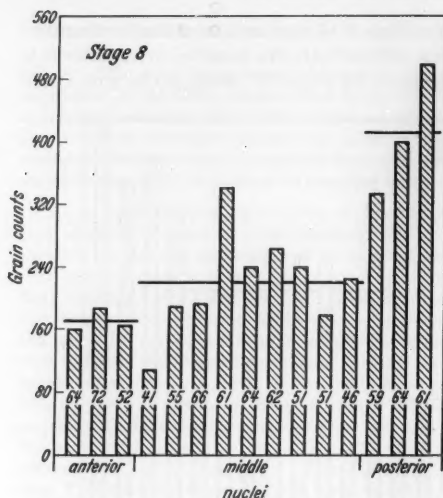


Fig. 3. Net grain counts on individual nuclei of stage 8

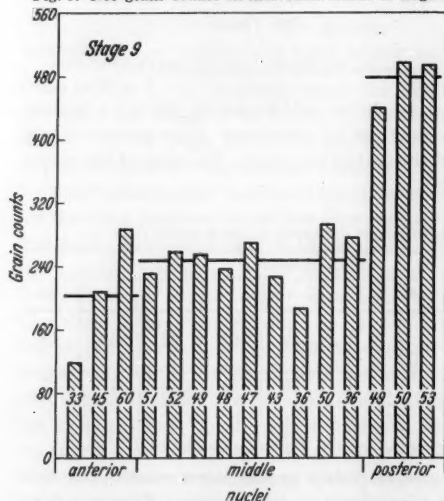


Fig. 4. Net grain counts on individual nuclei of stage 9

according to whether they have or have not yet synthesized DNA for the following mitosis. Counts on 92 follicle nuclei (Fig. 6) do in fact show a bimodal distribution compatible with two ploidy classes. The double correction for background and experimental error (0.81 and 0.16 counts per nucleus) probably causes, by introducing a comparatively large scaling error, the ratio of the two modes to be nearer to 1:3 than to the expected 1:2. (The distribution of the experimental error was also skewed towards low counts and apparently not bimodal.) The negative counts in Fig. 6 are the result of the correction on some nuclei with no associated grains. The count obtained from the follicle nuclei for the diploid amount of DNA is 2.5. Oocyte nuclei were not used for this determination because a sufficiently large sample was not available. However, the counts on a few of them were compatible with the 4n count, i. e. 4 or 5.

The counts on nurse nuclei in Fig. 2 were also analysed for a diploid value. The average count per nucleus in stage 2 is about 4, which, according to the previously obtained estimate of the diploid count,



indicates that these nuclei are above diploid level. It is therefore assumed that one reduplication of DNA takes place between stage 1 (not scored) and stage 2. The other reasons which strengthen such an assumption are as follows. In Table 2 it can be noted that the calculated volume of the nurse nucleus in stage 2 is in good agreement with the measured DNA volume. The latter doubles together with the total counts between stages 2 and 3. (The calculated nuclear volume increases more than expected because after stage 2 it becomes a progressively grosser overestimate.) Hence, in stage 1, where the nuclear volume is nearly half that of stage 2 nuclei, similarly halved DNA volume and total counts are to be expected. In support of this it will be seen later that there is generally good correlation between the DNA volume and ploidy from stages 2–9. It is likely then that stage 2 nuclei are at the  $4n$  level. The oocyte nucleus is also probably  $4n$  at this stage (KING *et al.*

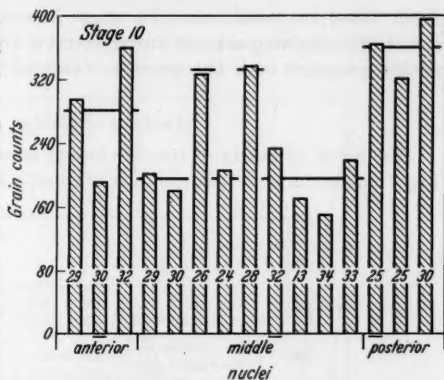


Fig. 5. Net grain counts on individual nuclei of stage 10

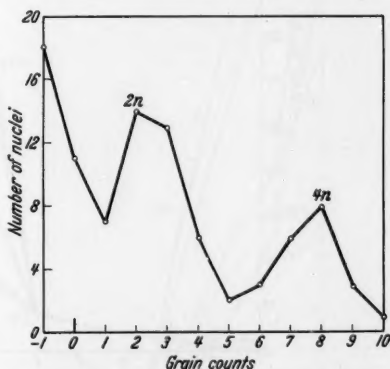


Fig. 6. Net grain counts on follicle nuclei

Table 2. Volumes of nurse nuclei ( $\mu^3$ ) and grain counts

	Stage		
	1	2	3
Individual nuclear volume <sup>1</sup>	47.7	87.1	268.0
DNA volume per nucleus	—	90.6	181.2
Total net count	—	61.7 <sup>2</sup>	155.7

<sup>1</sup> Calculated as sphere with diameters as in Table 1.

<sup>2</sup> Includes oocyte nucleus.



nucleus at stage 5, and cannot be used for an estimate of ploidy as in earlier stages and in stage 6 when all nuclei are of similar size. By stage 6 the fourth reduplication cycle has been completed in all the nuclei, which,

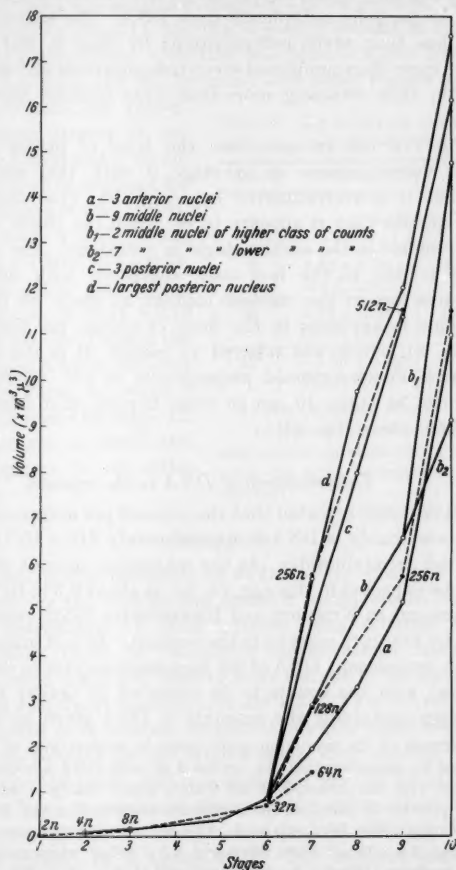


Fig. 8. Analysis of ploidy based on volume where DNA is present. Graphs a—c are averages. Broken lines indicate levels of ploidy

as far as they could be scored individually, showed about the same counts. Correspondingly, all nuclei are of equal size (Table 1).

After stage 6 the different nuclei diverge as to their DNA content. The posterior nuclei achieve eight reduplications by stages 8—9, reach-

ing 512n, and *lose* DNA by stage 10. The middle nuclei have undergone seven reduplications by stage 9 and have reached 256n. After that, while the majority of the middle nuclei *lose* DNA, a few of them do still continue to partially reduplicate their DNA. The anterior nuclei have achieved less than seven reduplications by stage 9. But, by stage 10 they have more than completed seven reduplications and perhaps entered the eighth, thus attaining more than 256n without showing any loss of DNA.

In Fig. 8 it can be seen that the level of ploidy as judged by the DNA volume agrees up to stage 9 with that determined from counts, but it is overestimated by stage 10. This overestimation is actually greater than it appears to be, when the likely overestimation of DNA volume in the earlier stages is considered. The overestimation of ploidy is due to the fact that, compared with other materials, DNA shares less in the nuclear content at stage 10 than at earlier stages. This is apparent in the drop of counts per unit area at this stage (Fig. 5), which was referred to earlier. It is also the impression gained with Feulgen-stained preparations *in toto*, where the paleness of the nuclei at stage 10 can go even beyond that depicted by KING *et al.* (1956, their Fig. 24).

#### *Determination of DNA in the ooplasm*

SCHULTZ (1956) reported that the amount per mature unfertilized egg of what presumably is DNA is approximately  $240 \times 10^{-9}$  mg, calculated from bound deoxyribosides. As the maximum amount of nuclear DNA that can be expected in this egg, i.e. 4n, is about  $0.3 \times 10^{-9}$  mg (from the diploid amount in KURNICK and HERSKOWITZ 1952), most of the DNA reported by SCHULTZ must be in the ooplasm. It is of interest to compare counts on cytoplasmic DNA of the immature oocytes in our preparations (see below) with the counts to be expected in similar preparations of mature eggs containing the amounts of DNA given by SCHULTZ.

An estimate of the maximum grain count in preparations of mature eggs can be obtained by assuming that the carbon-8 of both DNA adenine and guanine is equilibrated with the carbon-8 in the tracer, which clearly is an overestimation. It is then possible to calculate the maximum electron flux per  $100 \mu^2$  of sectioned ooplasm during three days exposure. The volume of the ooplasm in the mature egg is about  $8.4 \times 10^6 \mu^3$  when alive and  $5.5 \times 10^6 \mu^3$  when sectioned.  $500 \mu^3$  of sectioned ooplasm ( $100 \mu^2 \times 5 \mu$  thickness) will then contain  $220 \times 10^{-13}$  mg DNA, assuming that the nucleic acid is uniformly distributed and that it is not passively lost through attachment to fractions (yolk?) soluble in the histological reagents. This amount of DNA will contain  $0.2112 \times 10^{-13}$  mM adenine and  $0.1474 \times 10^{-13}$  mM guanine, calculated with the average of the values given by CHARGAFF (1955, Table IX). If the bases are equilibrated with the tracer (sp.act.: 9.6 mc/nM), together they contain  $344 \times 10^{-10} \mu\text{C }^{14}\text{C}$ , which will emit 3.3 electrons in three days. With a geometrical efficiency in the film of about fifty per cent and a grain yield of

two grains per incident electron, 3.3 grains per  $100 \mu^2$  of mature ooplasm are to be expected. This probably being a gross overestimation, the likelihood of achieving a significant count is therefore small.

Counts for immature oocytes in stages 8–12 are given in Table 3. The oocyte is mature by stage 14, but this is mostly present in ovaries older than the ones studied here. Counting was done at about  $20 \mu$  from the nurse or follicle cells, and the proximal and distal regions scored were separated by at least  $15 \mu$ . The experimental error (tracer unextracted by cold acid and both enzymes) per  $100 \mu^2$  of ooplasm for three days exposure was (proximal first): (stage 8  $3.17 \pm 0.40$ ), stage 9  $2.43 \pm 0.10$  and  $1.04 \pm 0.24$ , stage 10  $2.30 \pm 0.29$  and  $1.62 \pm 0.22$ , and stage 12  $2.44 \pm 0.18$  and  $2.16 \pm 0.30$ . In Table 3 the only counts significantly different from zero are those for stage 9 and the negative one for stage 12. In stage 9, counts on distal and proximal ooplasm do not differ significantly.

Table 3. Net counts on DNA per  $100 \mu^2$  ooplasm proximal and distal to nurse cells

Stage	Proximal	Distal
8	$1.50 \pm 0.77^1$ <i>81.4, 275.7</i>	
9	$5.30 \pm 0.56$ <i>224.3, 225.8</i>	$3.01 \pm 0.95$ <i>70.4, 95.8</i>
10	$0.14 \pm 0.31$ <i>453.1, 285.0</i>	$0.01 \pm 0.31$ <i>252.4, 201.0</i>
12	$-1.06 \pm 0.30$ <i>211.4, 339.2</i>	$0.17 \pm 0.42$ <i>359.4, 300.2</i>

<sup>1</sup> Net standard error.

In italics, first, total counts on DNA and, second, total counts for experimental error (in both background counts subtracted).

### Discussion

The present ploidy estimates of 512n for the posterior nuclei and 256n or more for the middle and anterior nuclei are to be compared with those determined by other authors using different techniques. HERTWIG (1935), based on volumetric considerations, found that the nurse nuclei could reach 256 times or more the size of the smallest follicle nuclei, which would correspond to at least 512n. PAINTER and REINDORF (1939) concluded from volume considerations that eight division cycles must occur to account for the largest nuclei they studied, which they estimated to be 512-ploid. But it is clear that the volume of the smallest nucleus must have doubled nine times, as the values given by PAINTER and REINDORF,  $65.4 \mu^3$  for the smallest and  $33,493 \mu^3$  for the largest nucleus, are related by a factor of  $2^9$ . The smallest oogonial nuclei measured by these authors being at least diploid, their largest nuclei would then actually be 1,024n. On the basis of volumetric as well as cytological considerations, BIER (1957) concluded that nuclei (probably of stage 10) larger than those measured by PAINTER and REINDORF could be 1,024-ploid, which again seems to us should read 2,048-ploid. In our preparations the nuclei showed a range of  $4.5$ – $48 \mu$  in diameter (Table 1),

which would mean that ten doublings in spherical volume occur or that, on the basis of volume, the largest nuclei are 2,048-ploid. The present work, however, proves that the nuclear volume is not reliable as an index of ploidy for the entire range of size of the nurse nuclei. Such an index applies at best only to the earliest stages (1 and 2), after which the calculated volumes become progressive overestimations. By comparison, the DNA volumes calculated from projected areas show good correlation with the level of ploidy up to stage 9, but thereafter this also becomes an overestimate. Photometric determinations by FREED and SCHULTZ (1956) and SCHULTZ (1956) have reached up to 1,024n, and in one particular genotype up to 2,048n, for the nurse nuclei. The maximum estimates presented by all these authors apply in all probability to the largest posterior nuclei in stage 9 or 10 chambers. HSU and HANSEN (1953) claimed on cytological grounds that the increase in nuclear volume is due to increase in length rather than in number of chromonemata. This view is opposed to that of PAINTER and REINDORF (1939) who described endomitotic cycles and increasing polyteny which, according to KING *et al.* (1956), is accompanied by the elongation of the chromosomes.

The chromosomes start development as more or less recognisable polytene chromosomes, but with later development the association of chromonemata becomes less intimate (PAINTER and REINDORF 1939), and subsists only in places (BIER 1957), so that typical polytene chromosomes are no longer recognisable. The increase of DNA on the whole by clear-cut successive reduplications (Fig. 7) lends support to the polytene nature of these chromosomes. Other supporting evidence comes from nurse nuclei in the mutant *jes* (KING *et al.* 1957) and from nurse nuclei which after irradiation (KING 1957a) or after treatment with 5-amino-uracil (KING, personal communication) occasionally show banded, polytene chromosome regions. Also typical banded polytene chromosomes, and intermediates between these and the fully dissociated polytene chromosomes of *Drosophila*, have been described in the nurse cells of several diptera other than *Drosophilidae* (STALKER 1954).

The present work indicates a pattern of enrichment in DNA and of its later degradation which is peculiar to the different nurse nuclei. All the nuclei in any one chamber at stages 1—3 show the same rate of increase in DNA and are therefore equivalent in respect of their DNA content. In stage 5 (perhaps also in stage 4, which was not scored) the various nuclei in the chamber are out of step with each other in their rate of increase of DNA. By stage 6 all again contain equal amounts of DNA. However, from stage 7 onwards the nuclei again diverge in their DNA content never again to equalize. The pattern of DNA enrichment and final degradation now becomes clearly polarized. The nuclei closest to the developing oocyte (the posterior nuclei) are richer in DNA than those

further away, i.e. the middle ones, which in turn are richer than the anterior ones (till stage 9). The posterior nuclei also attain their highest amount of DNA sooner than the middle ones, and most of the latter in turn attain their highest amount before the anterior nuclei. The loss of DNA by stage 10 is more definitely on the way for the posterior nuclei than for the middle nuclei (as a few of the latter are still increasing their DNA), while no loss is apparent for the anterior nuclei. It is also known that the posterior nuclei are the first to become pycnotic at a later stage (YAO 1949). In view of the last abortive cycle observed here in some of the middle nuclei, it is conceivable that an occasional posterior nucleus in a stage 10 chamber might still show an increase in its DNA and thus approximate to the 1,024n class observed by SCHULTZ (1956).

The non-homogeneous population of nurse nuclei with respect to their DNA content within a chamber, e.g. stage 5 or more clearly the nuclei at various positions in stage 7, would indicate different rates of DNA reduplication among the nuclei. If under an apparently similar cellular environment (as in a chamber), nuclei with initially similar DNA content come to differ widely in their rate of DNA increase during development, it is possible that different chromosomes within a nucleus may also differ in their rate of reduplication of the whole or part of their DNA. This could explain some of the intermediate grades of ploidy obtained for some nuclei and also the variation in DNA content especially noticeable amongst middle nuclei in stages 7 and 8. An asynchronous or unequal replication of chromonemata could easily lead to gene dosage effects, temporary in the first case or persistent in the second. Some instances of differential reduplication have already been described. Differences in the DNA reduplication of parts of chromosomes have been described for salivary chromosomes of *Rhynchosciara* (FICQ and PAVAN 1957, RUDKIN and CORLETTE 1957) and of a chironomid (STICH and NAYLOR 1958), and suggested for the heterochromatin of bean root nuclei (LA COUR and PELC 1958). Differences in the reduplication of structural protein (and presumably also DNA) of whole salivary chromosomes of *Drosophila*, resulting in different polyteny within a nucleus, have been described by SIRLIN and KNIGHT (1958, where other literature on the subject is cited). SCHULTZ (1956) believes that the Y chromosome in the nurse cells contains more DNA than would be expected cytologically.

JACOB (1958) has studied the susceptibility to the action of colchicine of the ovarian chambers present on eclosion of the fly. The pattern of susceptibility in stages 1 to 7 is polarized: the susceptibility decreases stepwise with increasing order of stages, stage 7 being the most resistant. From the increase in the DNA content of developing nurse nuclei shown here, it would seem that the susceptibility to colchicine is inversely related to the amount of DNA present in the chamber. This condition suggests



a mass effect based on the amount of DNA *per se* or, probably, of some other substance (structural proteins ?) stoichiometrically related to DNA.

The present data provide information on the rate of synthesis of DNA. The females studied here were sampled at most at 48 hours after emergence, during which period oogenesis is delayed, the reason for this being unknown (KING 1957). After 48 hours, oogenesis proceeds continuously and it attains its normal tempo. That this is a change of tempo and not of other qualities in the differentiation of the chamber is indicated by the similar morphology of the chambers before and after the 48 hour period. The similarity covers so many details of size and cytology of the oocyte, the nurse and follicle cells, that any important difference would have easily been noticed. The present data are therefore analysed using the duration of stages during the period of maximum oviposition determined by KING (1957) in the Oregon-R strain. The duration of all stages up to 7 is nearly ten hours at 25° C. The exceptions are stages 4 and 5 which are shorter, but which taken together also last for nearly ten hours. The duration of stages decreases rapidly from stages 8 to 10, being about four hours for stage 8 and less than one hour for stages 9 and 10 taken together. Up to stage 6, as discussed before, one reduplication of DNA per stage takes place in all nuclei in the chambers (considering stages 4 and 5 as one), i. e. DNA is replicated every ten hours. From then onwards the rate of DNA reduplication is much faster. In stage 7, lasting also ten hours, one reduplication occurs in the anterior nuclei, but two occur in the middle nuclei and three in the posterior ones. In stages 8 and 9, together lasting four and one-half hours, about two reduplications occur in the anterior nuclei and one in the middle and posterior nuclei. Considering  $0.15 \times 10^{-9}$  mg DNA as the diploid amount in *Drosophila* (KURNICK and HERSKOWITZ 1952), this represents a 10-fold increase from  $36 \times 10^{-9}$  mg DNA in all nurse nuclei in a stage 6 chamber to about  $335 \times 10^{-9}$  mg DNA in stage 9, taking place in fourteen hours. The instantaneous demand on precursors must therefore be so great that not surprisingly stage 8 proves the critical one in the development of the egg chamber (KING *et al.* 1956). The loss of DNA shown here for stage 10 must occur suddenly as the stage lasts only thirteen minutes (KING 1957).

The development of the ovarian chambers may be divided into three major phases. During the first phase (stages 1—6), when the oocyte remains relatively quiescent when compared with later phases, the nurse cells and the oocyte grow at identical rates, but reduplications of DNA occur in nurse nuclei every ten hours and the total DNA of the chambers increases gradually. In the second phase of development (stages 7—10), the increase in volume of the oocyte progressively takes the lead over that of the nurse cells. The onset of this phase (stage 7) is accompanied

by a sudden increase of total DNA in the chamber and the differentiation of the nurse nuclei in terms of DNA content. During this phase some nuclei reduplicate their DNA every 2–3 hours. In stage 8 and after, large particles (presumably protein) are emitted from the nurse nuclei (KING and DEVINE 1958) and yolk deposition in the oocyte begins. From stages 6 to 9, a 10-fold increase of total DNA in the nurse cells (see above) is correlated with a 100-fold increase in volume of the oocyte (KING *et al.* 1956). In the final phase (from stage 10 onwards), when the reduplication of DNA has ceased, the nurse cells regress while the oocyte is still vigorously growing at their expense (Fig. 9). Our data indicate loss of DNA in stage 10. This is to be linked up with the paleness and centralisation of the nuclear materials at this stage referred to by KING *et al.* (1956). After stage 10 the nurse cells break down, the nuclei shrink and disintegrate (KING *et al.* 1956), and the DNA undergoes depolymerization (YAO 1949). RNA, bound SH groups and acid phosphatase, which were very noticeable in earlier stages, start to decrease in the cytoplasm (YAO 1949, 1950). The submicroscopic appearance of the nuclei has also radically changed by about these stages, i.e. membranes become very obvious in the central regions (C. H. WADDINGTON and E. OKADA, unpublished). Eventually at stage 13 the nurse cells are resorbed except for some debris. At this time the development of the oocyte is reaching completion. The loss of DNA from the nurse nuclei shown here could contribute to the acid-soluble thymine and other nucleosides found by TRAVAGLINI, LEVENBOOK and SCHULTZ (1958) in the mature ooplasm. Whether it also contributes to ooplasmic DNA is uncertain (see below). It seems quite unlikely that this loss would consist only of the DNA purines into which the radioactive carbon would have mainly entered.

In the ooplasm the concentration of DNA rises in stage 9 and decreases thereafter (Table 3). At stage 9 the follicular epithelium has almost reached its maximum height, which is attained in stage 10, above the oocyte (KING *et al.* 1956). As recently there is rather direct evidence in *Gryllus* of the follicle cells contributing DNA to the ooplasm (DURAND 1958), the increase in counts in stage 9 may be the result of follicular activity. It should be pointed out, however, that at stages 8 to 10 the vitelline membrane (KING and DEVINE 1958) begins to be deposited



Fig. 9. A stage 10 chamber not treated with enzymes. Cytoplasm from the nurse cells flows into the growing oocyte through the gap in the epithelial wall. Methyl green-pyronin

between the follicle cells and the ooplasm. Between stages 9 and 12 the volume of the ooplasm increases by a factor of 17 (KING *et al.* 1956), which, if the total DNA does not increase proportionally, would decrease the counts per area. It could be that the nurse nuclei breaking down after stage 9 mainly contribute acid-soluble nucleosides to the ooplasm.

### Summary

The relative DNA content of the ovarian nurse nuclei of *Drosophila melanogaster* has been measured by high-resolution autoradiography of DNA uniformly labelled with adenine-8-<sup>14</sup>C.

The various nurse nuclei show a defined pattern of DNA classes. The posterior nuclei, i. e. those nearest to the oocyte, achieve eight reduplications of DNA by stages 8–9, thus reaching 512n, and all have lost some DNA by stage 10. The nuclei in the middle of the chamber achieve seven reduplications of DNA by stage 9, thus reaching 256n, and though there is loss of DNA in the majority of these nuclei at stage 10 some of them might enter a new reduplication cycle. The anterior nuclei, i. e. those more distant from the oocyte, achieve more than seven reduplications by stage 10 and show no loss of DNA.

After stage 6 of the ovarian chambers the pattern of DNA enrichment and later degradation is clearly polarized in that there is a posterior-anterior gradient for the level of ploidy, the order in time in which this is attained, and the loss of DNA. The dominant end of the gradient is towards the developing oocyte.

The measured nuclear volume where DNA is present is well correlated with ploidy till stage 9. Compared with earlier stages, at stage 10 DNA shares less in the nuclear contents than other materials. The nuclear volume when calculated as a sphere is a gross overestimation, except for the earliest stages.

Various possibilities likely to bring about differences in the amount of DNA among nurse nuclei within and between chambers are discussed.

**Acknowledgment.** It is a pleasure to thank Professor C. H. WADDINGTON, F. R. S., for his personal interest in this work and Dr. R. C. KING for discussion. Thanks are also due to Mr. J. NELSON for technical assistance and to Mr. E. D. ROBERTS for illustrations. One of us (J. J.) is grateful to the Royal Commission for the Exhibition of 1851, London, for a research award.

### References

- ALDERSON, T.: Culture conditions and mutagenesis in *Drosophila melanogaster*. *Nature* (Lond.) **179**, 974–975 (1957).  
BIER, K. E.: Endomitose und Polytanie in den Nährzellkernen von *Calliphora erythrocephala* MEIGEN. *Chromosoma* (Berl.) **8**, 493–522 (1957).

- CHARGAFF, E.: Isolation and composition of the deoxypentose nucleic acids and of the corresponding nucleoproteins. *Nucleic Acids* (E. CHARGAFF and J. N. DAVIDSON, editors) **1**, 307—368 (1955).
- DURAND, M. C.: Incorporation de thymidine tritiée dans l'ovaire des gryllides (Orth.). *Exp. Cell Res.* **15**, 257—259 (1958).
- FICQ, A., and C. PAVAN: Autoradiography of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angelae* at different stages of larval development. *Nature* (Lond.) **180**, 983—984 (1957).
- FREED, J. J., and J. SCHULTZ: Effect of the Y chromosome on the DNA content of ovarian nuclei in *Drosophila melanogaster* females. *J. Histochem. Cytochem.* **4**, 441—442 (1956).
- HERTWIG, G.: Die Vielwertigkeit der Speicheldrüsenkerne und Chromosomen bei *Drosophila melanogaster*. *Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* **70**, 496—501 (1935).
- Hsu, W. S., and R. W. HANSEN: The chromosomes in the nurse cells of the ovary of *Drosophila melanogaster*. *Cytologia* (Tokyo) **18**, 330—342 (1953).
- JACOB, J.: A study of colchicine induced sterility in the female fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Growth* **22**, 17—29 (1958).
- KING, R. C.: Oogenesis in adult *Drosophila melanogaster*. II. Stage distribution as a function of age. *Growth* **21**, 95—102 (1957). — The cytology of the irradiated ovary of *Drosophila melanogaster*. *Exp. Cell Res.* **13**, 545—552 (1957a).
- , R. G. BURNETT and N. A. STALEY: Oogenesis in adult *Drosophila melanogaster*. IV. Hereditary ovarian tumours, *Growth* **21**, 239—261 (1957).
- , and R. L. DEVINE: Oogenesis in adult *Drosophila melanogaster*. VII. The sub-microscopic morphology of the ovary. *Growth* (in press).
- , A. C. RUBINSON and R. F. SMITH: Oogenesis in adult *Drosophila melanogaster*. *Growth* **20**, 121—157 (1956).
- KURNICK, N. B., and I. H. HERSKOWITZ: The estimation of polyteny in *Drosophila* salivary gland nuclei based on determination of desoxyribonucleic acid content. *J. cell comp. Physiol.* **39**, 281—299 (1952).
- LA COUR, L. F., and S. R. PELC: Effect of colchicine on the utilization of labelled thymidine during chromosomal reproduction. *Nature* (Lond.) **182**, 506—508 (1958).
- MERRIAN, R. W.: Standard chemical fractionation as a basis for quantitative investigations of substances other than DNA. *J. Histochem. Cytochem.* **6**, 43—51 (1958).
- PAINTER, T. S., and E. C. REINDORP: Endomitosis in the nurse cells of the ovary of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* (Berl.) **1**, 276—283 (1939).
- RUDKIN, G. T., and S. L. CORLETTE: Disproportionate synthesis of DNA in a polytene chromosome region. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **43**, 964—968 (1957).
- SCHULTZ, J.: The relation of the heterochromatic chromosome regions to the nucleic acids of the cell. *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* **21**, 307—328 (1956).
- SIRLIN, J. L., and G. R. KNIGHT: The pattern of protein sulphur after Feulgen hydrolysis in the salivary gland chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* (Berl.) **9**, 119—159 (1958).
- STALKER, H. D.: Banded polytene chromosomes in the ovarian nurse cells. *J. Hered.* **45**, 259—264 (1954).
- STICH, H. F. and J. M. NAYLOR. Variation of desoxyribonucleic acid content of specific chromosome regions. *Exp. Cell Res.* **14**, 442—445, (1958).

- TRAVAGLINI, E. C., L. LEVENBOOK and J. SCHULTZ: Nucleic acids and their composition as affected by the Y chromosome of *Drosophila melanogaster*. II. Nucleosides and related compounds in the acid soluble fraction of the unfertilized egg. *Exp. Cell Res.* **15**, 62—79 (1958).
- YAO, T.: Cytochemical studies on the embryonic development of *Drosophila melanogaster*. I. Protein sulphydryl groups and nucleic acids. *Quart. J. micr. Sci.* **90**, 401—409 (1949). — II. Alkaline and acid phosphatases. *Quart. J. micr. Sci.* **91**, 79—88 (1950).

Dr. J. JACOB  
Annamalai University,  
Marine Biological Station,  
Porto Novo, India

Dr. J. L. SIRLIN  
Institute of Animal Genetics,  
West Mains Road,  
Edinburgh, Scotland

